



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Estudio de los factores moleculares en juego en la
evolución de las enzimas metalo- β -lactamasas”

Presentada por María Rocío Meini

Rosario, Argentina
2014

“Estudio de los factores moleculares en juego en la evolución de las enzimas metalo- β -lactamasas”

María Rocío Meini

Licenciada en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) y en la Cátedra de Biofísica, Departamento de Química Biológica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1° de abril de 2009 y el 30 de abril de 2014, bajo la dirección del Dr. Alejandro J. Vila.

A Jeremías Martín, gracias por elegirme y revolucionar mi vida. Por iluminar mis días con tu sonrisa, gracias.

A Gustavo, gracias por el apoyo día a día, por tu amor y paciencia.

A mi familia, mamá, papá, Ire y Milucha, por ser un soporte incondicional, mi tribu que me acompaña en todo.

Agradezco al Dr. Alejandro J. Vila por haberme dirigido durante la realización de este trabajo de Tesis, por su confianza, por su predisposición constante para invitarme a afrontar nuevos desafíos, por preocuparse por mi formación científica sin dejar de lado mis emociones personales. Gracias por escucharme y comprenderme.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Formación Científica y Tecnológica (ANPCyT) por las becas y fondos para la realización de este trabajo.

A la facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, y al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) por facilitarme el lugar de trabajo y el uso de equipamiento.

Al Dr. Oscar Roveri, por darme un espacio en la cátedra de Biofísica para desempeñarme como docente.

Al Dr. Daniel Weinreich (Department of Ecology and Evolutionary Biology Brown University) por su lectura crítica del trabajo, por sus sugerencias, aportes y discusión.

A mis compañeros de laboratorio: Ogi, Luciano, Pablo, Lisandro, Liana, Jime, Jorgelina, Mariano, Andrés, Marcos, Soraya, Antonela, Guille, Leticia, Bruno, Estefanía, Fito, Paula e Irina, gracias por acompañarme en estos años.

A Pablo, por guiarme durante la tesina y en los primeros años de la tesis, gracias por su paciencia y por darme siempre una palabra de ánimo ante las dificultades.

A Ogi y Luciano, fue un gusto compartir con ellos los primeros años de tesis en el laboratorio, gracias por sus consejos y amistad y por enseñarme con su ejemplo lo que es la vocación científica.

A Lisandro, gracias por sus aportes y consejos, por enseñarme lo que significa el trabajo en equipo y la ayuda desinteresada.

A Mariano, gracias por su ayuda para desenmarañar a nuestras mutantes compartidas.

A Andrés, Marcos, Soraya, Antonela, Bruno y Estefi, gracias por la buena onda, por hacer del lab una familia.

A Guille, gracias por aguantarme siendo su directora asistente, por enseñarme con sus planteos, por escucharme y permitirme participar en su formación.

A todos los integrantes del IBR por la ayuda brindada, compañeros de laboratorio, administrativos y técnicos, gracias por hacer de este Instituto un lugar agradable para trabajar.

A mis amigas de la secundaria y de la facu, gracias por estar. A mis compañeras de panza y amigas del alma, gracias por el apoyo en este último tramo.

Índice General

Abreviaturas	1
Capítulo 1. Introducción General	2
1.1 El inicio de la era antibiótica y la problemática de la resistencia bacteriana	2
1.2 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos y mecanismos de resistencia	4
1.3 Resistencia mediada por enzimas β -lactamasas: descripción general y situación actual en la clínica	6
1.4 Evolución de los mecanismos de resistencia: el caso de la β -lactamasa TEM	8
1.5 Evolución de las metalo- β -lactamasas	10
1.5.1 Metallo- β -lactamasas y superfamilia: características comunes y particularidades de la actividad lactamasa	10
1.5.2 Evolución de las MBLs ante la presión de selección contra nuevos sustratos	12
1.6 Objetivos de esta Tesis	14
Capítulo 2. Materiales y Métodos	15
2.1 Plásmidos	15
2.1.1 Plásmido pKP	15
2.1.2 Plásmido pET-Term	16
2.2 Soluciones amortiguadoras	16
2.3 Medios de cultivo	17
2.4 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	17
2.5 Técnicas de Biología Molecular	17
2.5.1 Purificación de ADN plasmídico	17
2.5.2 Electroforesis en geles de agarosa	18
2.5.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	18
2.5.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	18
2.5.5 Reacciones de ligación	19
2.5.6 Mutagénesis sitio-dirigida	19
2.5.7 Preparación y transformación de células de <i>E. coli</i> utilizando CaCl_2	21
2.6 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	21
2.7 Preparación de extractos de periplasma y de células totales	22
2.8 Medidas de actividad empleando extractos periplasmáticos	23
2.9 Western Blots	24

2.10	Determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs)	25
2.11	Expresión y purificación de enzimas recombinantes	25
2.11.1	Inducción de la expresión en células de <i>E. coli</i>	25
2.11.2	Ruptura celular	26
2.11.3	Separaciones cromatográficas	27
2.11.4	Cuantificación de enzimas.....	28
2.11.5	Preparación de apo-enzimas.....	28
2.11.6	Concentración de muestras de proteínas	28
2.12	Técnicas para la caracterización bioquímica de las enzimas	28
2.12.1	Determinación del contenido de Zn(II) utilizando el quelante colorimétrico PAR ...	28
2.12.2	Espectroscopía de Dicroísmo Circular	30
2.12.3	Medidas de actividad β -lactamasa.....	30
2.13	Determinaciones de estabilidad.....	31
2.13.1	Ensayos de termoestabilidad empleando extractos periplasmáticos.....	31
2.13.2	Medidas de estabilidad empleando enzimas purificadas	32
2.14	Determinación de constantes de disociación proteína-Zn(II) mediante ensayos de competición con PAR	33
2.14.1	Determinación de la constante de disociación del complejo (PAR) ₂ Zn	33
2.14.2	Determinación de las constantes de disociación para la enzima BcII o sus variantes mediante competición con PAR.....	34
Capítulo 3.	Análisis de la selección de residuos ligandos de Zn(II) inusuales en la evolución de las MBLs. Estudio de la mutante C221D de la enzima BcII de <i>Bacillus cereus</i>	36
3.1	Introducción	36
3.2	Resultados	39
3.2.1	Dependencia de la actividad <i>in vitro</i> de BcII-C221D respecto a la cantidad de Zn(II) en el medio de reacción.	39
3.2.2	Caracterización del comportamiento de la enzima BcII-C221D vs BcII-wt en extractos periplasmáticos de <i>E. coli</i> . Niveles de expresión y actividad.	41
3.2.3	Medidas de afinidad por Zn(II) de BcII wt y BcII C221D. Determinación de las constantes de disociación por competición con el quelante PAR.	43
3.3	Discusión	47
Capítulo 4.	Descripción del “paisaje de aptitud” en metalo- β -lactamasas utilizando como modelo de estudio BcII y variantes obtenidas mediante Evolución Molecular Dirigida	50

4.1	Introducción	50
4.1.1	Marco teórico en evolución de proteínas: “paisaje de aptitud”	50
4.1.2	Paisaje de aptitud en metalo- β -lactamasas	52
4.2	Resultados	53
4.2.1	Reconstrucción de los caminos evolutivos hacia la variante de BcII optimizada contra cefalexina y detección de interacciones epistáticas.	53
4.2.2	Óptimos alternativos y diversificación de caminos.	56
4.3	Discusión	57
Capítulo 5.	Contribución de las propiedades moleculares en la capacidad de conferir resistencia de las metalo- β -lactamasas.	59
5.1	Introducción	59
5.2	Resultados	62
5.2.1	Caracterización cinética <i>in vitro</i> de las variantes de BcII que contienen la mutación G262S junto con las distintas combinaciones de N70S, V112A y L250S.	62
5.2.2	Medidas de actividad en extractos periplasmáticos y correlación con parámetros de resistencia.	67
5.2.3	Medidas de estabilidad en extractos periplasmáticos y con preparaciones de proteína pura.	73
5.2.4	Efecto de la disponibilidad de Zn(II) en la capacidad de conferir resistencia de BcII y sus variantes optimizadas y su relación con la afinidad por Zn(II) de dichas enzimas.	76
5.2.5	Contribución de las propiedades proteicas analizadas en la capacidad de conferir de resistencia para distintos antibióticos β -lactámicos	81
5.3	Discusión	83
5.3.1	Contribución de la actividad enzimática a la aptitud y efectos adicionales revelados por las medidas en periplasma	83
5.3.2	Contribución de la estabilidad a la capacidad de conferir resistencia de las MBLs ..	84
5.3.3	Optimización de la unión de Zn(II) en la evolución de las MBLs	87
5.3.4	Efectos de las propiedades proteicas estudiadas en la capacidad de conferir resistencia de las MBLs para distintos antibióticos β -lactámicos	91
5.3.5	Descripción del mapa genotipo-aptitud en MBLs	92
Conclusiones	96
Resumen	98
Bibliografía	101

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura básica de las familias de antibióticos β -lactámicos.	3
Figura 2: Esquema representativo de la evolución natural de la β -lactamasa TEM-1 en paralelo a la introducción de nuevos antibióticos β -lactámicos y de las variantes obtenidas mediante Evolución Molecular Dirigida.	9
Figura 3: Estructura cristalográfica de la MBL BclI de <i>Bacillus cereus</i>	10
Figura 4: Características conservadas del sitio activo dentro de las proteínas de la superfamilia de MBLs y diferencias con las enzimas MBLs.	11
Figura 5: Diagrama del vector pKP-BclI.	15
Figura 6: Diagrama del vector pET-Term BclI.	16
Figura 7: Curva de calibración PAR-Zn.	29
Figura 8: Determinación de la constante de disociación del complejo (PAR) ₂ Zn.	34
Figura 9: Sitio activo de la MBL BclI de <i>B. cereus</i>	36
Figura 10: Estructura de los sitios activos de BclI-C221D en sus formas mono- y di-Zn(II).	38
Figura 11: Dependencia de la actividad enzimática respecto a la concentración de Zn(II) en el medio para las enzimas BclI-wt y BclI-C221D.	40
Figura 12: Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas BclI-wt y BclI-C221D en células de <i>E. coli</i>	42
Figura 13: Actividad de las enzimas BclI-wt y BclI-C221D en extractos periplasmáticos con y sin exceso de Zn(II) en el medio de reacción.	43
Figura 14: Espectros correspondientes a los experimentos de competencia por Zn(II) entre el quelante cromogénico PAR y la apo-proteína BclI-C221D.	45
Figura 15: Ensayos de competición con PAR para la determinación de la afinidad por Zn(II) de las enzimas BclI-wt y BclI-C221D.	45
Figura 16: Representación esquemática de la epistasis entre mutaciones y la accesibilidad de caminos adaptativos.	51
Figura 17: Estructura química de la cefalosporina cefalexina.	52
Figura 18: Caminos evolutivos posibles desde BclI-wt hasta la variante optimizada GLVN.	54
Figura 19: Epistasis entre las mutaciones G262S, L250S, V112A y N70S agrupadas de a pares en distintos contextos genéticos.	55
Figura 20: Estructura cristalográfica de la mutante GLVN.	62
Figura 21: Evaluación del estado de plegamiento de las variantes de BclI mediante espectroscopia de dicróismo circular.	63
Figura 22: Parámetros cinéticos frente a distintos antibióticos β -lactámicos para las variantes de BclI relativos a la enzima silvestre.	66
Figura 23: Actividad específica determinada en extractos periplasmáticos para BclI-wt y sus variantes.	68
Figura 24: Curvas de velocidad inicial versus concentración de sustrato en extractos periplasmáticos para las variantes de BclI.	69
Figura 25: Parámetros cinéticos aparentes determinados en periplasma en comparación con los parámetros cinéticos determinados con las enzimas purificadas.	70

Figura 26: Cantidades de enzima exportada al periplasma de <i>E.coli</i> relativa a BcII-wt.	71
Figura 27: Niveles de expresión de BcII y las variantes en extractos de células totales y extractos periplasmáticos de células <i>E. coli</i>	72
Figura 28: Curvas de termoestabilidad realizadas con extractos periplasmáticos.	74
Figura 29: Curvas de termoestabilidad realizadas con enzimas purificadas.	75
Figura 30: Comparación de los valores de temperatura de transición obtenidos mediante distintos métodos.	76
Figura 31: Ensayos de competición con PAR para la determinación de la afinidad por Zn(II) de las enzimas BcII-wt y las variantes G, GN, GVN y GLVN.	80
Figura 32. Estructura química de las cefalosporinas cefalexina, cefotaxima y ceftazidima.	81
Figura 33: Representación del carozo hidrofóbico del residuo en la posición 112 en las estructuras de BcII y de GLVN.	85
Figura 34: Residuos conservados en las MBLs de subclase que participan en el carozo hidrofóbico del residuo en la posición 112.	86
Figura 35: Comparación de las estructuras de BcII-wt y la mutante cuádruple GLVN.	88
Figura 36: Cambios producidos por las mutaciones G262S y N70S en el sitio Zn ² de BcII.	90
Figura 37: Correlación entre los valores de CIMs para cefalexina conferidos a <i>E. coli</i> y la actividad de cada enzima <i>in vitro</i> y en periplasma.	93
Figura 38: Representación cuantitativa de la contribución de distintos factores proteicos a la capacidad de conferir resistencia.	95

Índice de Tablas

Tabla 1: Longitud de onda y coeficientes de absortividad molar utilizados para seguir las reacciones de hidrólisis espectrofotométricamente.	30
Tabla 2: Constantes de disociación para el primer y segundo evento de unión de Zn(II) para BcII-wt y BcII-C221D estimadas mediante ensayos de competición con el compuesto PAR	46
Tabla 3. Nomenclatura para las variantes de BcII según las mutaciones presentes.	53
Tabla 4: Variantes distintas de GLVN seleccionadas a altas concentraciones de cefalexina y sus respectivas CIMs.	56
Tabla 5. Determinación del contenido de Zn(II) para las preparaciones de proteína pura.	64
Tabla 6. Parámetros cinéticos en estado estacionario para BcII-wt y sus variantes.	65
Tabla 7. Parámetros cinéticos aparentes para el sustrato cefalexina determinados con extractos periplasmáticos de BcII-wt y sus variantes.	70
Tabla 8: Valores de T_{Ma} obtenidos a partir de las curvas de termoestabilidad realizadas con extractos periplasmáticos.	74
Tabla 9: Valores de CIMs para cefalexina ($\mu\text{g/ml}$) para células de <i>E.coli</i> expresando BcII-wt o las variantes a concentraciones de Zn(II) variable.	78
Tabla 10: Constantes de disociación para el primer y segundo evento de unión de Zn(II) para BcII-wt y las variantes estimadas mediante ensayos de competición con el compuesto PAR.	79
Tabla 11: Valores de CIMs para ceftazidima y cefotaxima ($\mu\text{g/ml}$) conferidos a <i>E.coli</i> por las enzimas BcII y sus variantes en medio con y sin Zn(II) en exceso.	82
Tabla 12: Distancias metal-ligando (\AA) correspondientes al sitio activo de las enzimas BcII-wt (PDB 1BC2) y la mutante GLVN (PDB 3FCZ).	89

Abreviaturas

ADNasa	Desoxirribonucleasa
BSA	Albúmina sérica bovina
DC	Dicroísmo Circular
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
eq.	Equivalentes
GST	Glutación-S-transferasa
HEPES	N-[2-Hidroxietil]piperazine-N'-[2-ácido etanosulfónico]
k_{cat}	Número de recambio
K_D	Constante de disociación
K_M	Constante de Michaelis
MBLs	Metalo- β -lactamasas
PAR	4-(2-piridilazo)-resorcinol
PBPs	Proteínas de unión a penicilina
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RMN	Resonancia magnética nuclear
SBL	Serín- β -lactamasas
ESBL	β -lactamasas de espectro expandido
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio
wt	silvestre

Capítulo 1. Introducción General

1.1 El inicio de la era antibiótica y la problemática de la resistencia bacteriana

“El mayor de los males en la automedicación es el uso de dosis demasiado pequeñas, tal que en lugar de eliminar la infección, les enseña a los microbios a resistir la penicilina”

Alexander Fleming

New York Times, 1945

En 1928, Alexander Fleming observó que una colonia de un hongo había crecido en una de sus placas de Petri sembradas con *Staphylococcus aureus* [1]. A cierta distancia alrededor de la colonia del hongo, las colonias de la bacteria se habían vuelto translúcidas, un fenómeno indicativo de lisis celular. Fleming realizó experimentos con el medio de cultivo filtrado de este hongo, identificado como *Penicillium notatum*, observando que poseía capacidad bacteriostática, bactericida y bacteriolítica contra varios de los patógenos humanos. A este filtrado lo llamó penicilina [1]. En 1940, durante la Segunda Guerra Mundial, Howard Florey y Ernst Chain retomaron el trabajo de Fleming [2] y propulsaron la producción a gran escala de penicilina en Estados Unidos e Inglaterra. La estructura química de la penicilina fue dilucidada por Dorothy Crowfoot Hodgkin entre 1942 y 1945 [3]. Dicha estructura se caracteriza por la presencia de un anillo de amida cíclico de cuatro miembros, llamado β -lactama, fusionado a otro tiazolidínico (Figura 1). Hacia 1943, la penicilina se convirtió en el principal antibiótico utilizado para tratar infecciones en los heridos de guerra [4], lo que permitió salvar millones de vidas en ese momento. De esta manera, se inició el uso terapéutico masivo de los denominados antibióticos β -lactámicos.

Fleming anticipó las precauciones que debían tenerse respecto al uso inadecuado de la penicilina, luego de observar experimentalmente que el uso de dosis no letales del antibiótico permitía el crecimiento de bacterias resistentes [5]. Al poco tiempo de la implementación de la penicilina como antibiótico se detectó resistencia a la misma en cepas de *Staphylococcus aureus*. Dicha resistencia ascendió hasta un valor del 80% en 1953 en los aislados hospitalarios de *S. aureus* en todo el mundo [6]. Esto llevó al desarrollo de nuevas variantes semi-sintéticas de la penicilina (metecilina, oxacilina, etc.), capaces de evadir la resistencia bacteriana.

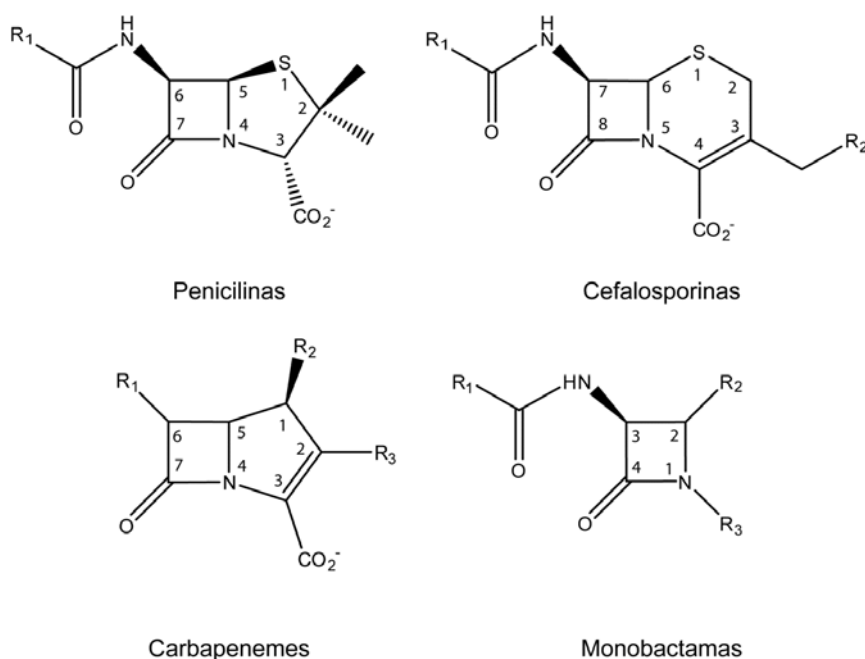


Figura 1: Estructura básica de las familias de antibióticos β -lactámicos.

El anillo β -lactámico es característico de estos compuestos. También comparten el grupo carboxilato unido a C3 (C4 en cefalosporinas), excepto en las monobactamas. Los grupos R diferencian a las variantes de cada familia.

Debido a los problemas de resistencia, en las décadas siguientes se impulsó la búsqueda y desarrollo de nuevos grupos de antibióticos β -lactámicos. A partir de los años '60 comenzaron a emplearse las cefalosporinas, descubiertas en extractos del moho *Cephalosporium acremonium* [4] (Figura 1). Existen numerosas variantes de las cefalosporinas, principalmente derivados semi-sintéticos, las cuales se agrupan en generaciones según sus características antimicrobianas, siendo las de mayor espectro de acción las de tercera y cuarta generación [7].

Un grupo menor de antibióticos está constituido por las monobactamas, descubiertas como metabolitos producidos por especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* [4] (Figura 1). El único antibiótico monobactámico de uso clínico, denominado aztreonam, se obtuvo por síntesis y comenzó a usarse a partir de la década de los años '80 [8].

Por último, los carbapenemes (Figura 1), producidos por cepas de *Streptomyces cattleya*, se implementaron con mucho éxito desde mediados de los años '80. Su espectro de actividad frente a bacterias es el más amplio de todos los antibióticos β -lactámicos [8]. Los carbapenemes constituyen actualmente los antibióticos de último recurso para el tratamiento de infecciones, dado que no son afectados por los mecanismos de resistencia más comunes contra

los demás β -lactámicos [9]. Sin embargo, en los últimos años han surgido mecanismos eficientes de resistencia contra los carbapenemes, como se describirá más adelante.

La historia desde la introducción de antibióticos para el tratamiento de infecciones nos muestra que cada vez que se ha probado la efectividad de un nuevo antibiótico y éste se pone en uso en forma masiva, sus días están contados [10]. La resistencia a antibióticos β -lactámicos (así como la de otros antibióticos que son también productos naturales) antecede a la implementación de los mismos en la clínica y responde a mecanismos de competencia por el mismo nicho ecológico entre microorganismos [11]. La intervención del hombre mediante el uso de los antibióticos pre-existentes y de nuevas variantes químicas ha llevado a un desequilibrio de la ecología microbiana donde las bacterias también compiten con los humanos.

En esta competencia, las poblaciones bacterianas cuentan con ventajas para adaptarse rápidamente a cambios en el medio. Por un lado, su rápida tasa de multiplicación permite que haya una alta probabilidad de que ocurran mutaciones al azar que resulten favorables. Por otro lado, los mecanismos de transferencia horizontal de material genético entre bacterias aceleran la dispersión de los genes de resistencia [12]. El antibiótico elimina las bacterias sensibles dejando lugar a que se reproduzcan fácilmente aquellas que resultaron resistentes. El mal uso que se realiza de los antibióticos deja a los humanos en desventaja: la prescripción indiscriminada, la venta sin prescripción, la interrupción de tratamientos y las grandes cantidades de antibióticos que se emplean en ganado y cultivos, generan condiciones ideales para la selección de cepas resistentes [10,12]. Esta situación ha llevado a una fuerte desinversión en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos en la industria farmacéutica y, como consecuencia, a una disminución notable del número de antibióticos aprobados en los últimos años [13].

1.2 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos y mecanismos de resistencia

El mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos consiste en inhibir un paso clave en la biosíntesis de peptidoglicano, que constituye la capa de la pared celular bacteriana que confiere resistencia osmótica [10,11]. La capa de peptidoglicano está compuesta por un entramado de hebras de péptidos y glicanos que presenta entrecruzamientos mediante uniones covalentes. Las hebras peptídicas están conectadas mediante enlaces amidas generados por enzimas transpeptidasas. La incorporación de nuevas unidades de peptidoglicano es catalizada por

enzimas transglicosilasas. Los blancos de acción de los antibióticos β -lactámicos son enzimas bifuncionales que contienen ambos dominios, de transpeptidación y de transglicosilación. A estas proteínas se las denomina “proteínas de unión a penicilina” (PBPs, por sus siglas en inglés). En el caso de bacterias Gram negativas, estas proteínas se encuentran en el espacio periplasmático o ancladas a la membrana interna con el sitio activo expuesto al periplasma, por lo que el antibiótico sólo debe atravesar la membrana externa para encontrar su blanco de acción [10,11].

Los antibióticos β -lactámicos actúan como pseudosustratos de las PBPs debido a su similitud estructural con el dímero de D-alanina terminal del peptidoglicano, el sustrato natural del dominio transpeptidasa. La reacción con el sustrato natural cursa mediante dos pasos: uno de acilación al residuo de Ser del sitio activo, donde se rompe el dímero D-Ala/D-Ala, y el otro de desacilación, donde el grupo acilo se transfiere a un grupo amino de una cadena vecina para el entrecruzamiento. El paso de desacilación que tiene lugar con el sustrato natural no ocurre con el antibiótico β -lactámico, sino que éste queda unido en forma irreversible a la enzima. De esta manera, se previene el entrecruzamiento normal en la capa de peptidoglicano [11]. La hipótesis más simple, y a la cual aún se hace referencia, es que esto debilita la pared celular provocando lisis celular por estrés osmótico [14]. Sin embargo, el mecanismo es más complejo y procede mediante distintas vías. Los antibióticos β -lactámicos por un lado perturban el delicado balance del metabolismo de la pared celular, tanto debilitando su estructura como por inducción de la autólisis [15] y a su vez disparan un mecanismo de muerte celular programada [16].

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden volverse resistentes a los antibióticos β -lactámicos. En bacterias Gram-negativas puede tener lugar la alteración en la permeabilidad de la membrana externa por delección de porinas o la adquisición y activación de bombas que expulsan los antibióticos desde el periplasma hacia el medio externo. En otros casos, por ejemplo en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (conocidas como MRSA por sus siglas en inglés), tiene lugar la modificación del blanco de acción, es decir, la expresión de PBPs que no son sensibles a los β -lactámicos [11].

Sin embargo, el más común de los mecanismos de resistencia consiste en la producción de enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas, conocidas como β -lactamasas (E.C. 3.5.2.6) catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactama. El producto que se obtiene no es funcional como pseudosustrato y, por lo tanto, no resulta útil como antibiótico [11].

1.3 Resistencia mediada por enzimas β -lactamasas: descripción general y situación actual en la clínica

Se conocen dos tipos generales de β -lactamasas: las serin- β -lactamasas (SBLs) y las metalo- β -lactamasas (MBLs). Las SBLs están relacionadas evolutivamente con las PBPs y, al igual que éstas, presentan un residuo de Ser en el sitio activo que cumple un rol central en la catálisis. El mecanismo de hidrólisis se basa en los pasos de acilación/desacilación. En base a dicho mecanismo, se han diseñado inhibidores que quedan atrapados en el paso de acilación y así inactivan la enzima, como es el caso del ácido clavulánico y el sulbactam. Las MBLs, en cambio, no poseen ninguna relación con las PBPs, y dependen de la presencia de uno o dos iones Zn(II) en su sitio activo para la catálisis. Las β -lactamasas se clasifican en cuatro clases: A, C y D corresponden a SBLs y la clase B corresponde a las MBLs [11].

Las SBLs se han caracterizado históricamente por estar altamente especializadas contra un tipo de sustrato, penicilinas o cefalosporinas, habiendo alcanzado en algunos casos eficiencias catalíticas cercanas al límite difusional [11]. Sin embargo, desde principio de los años '90 se disparó el número de variantes conocidas como " β -lactamasas de espectro extendido" (ESBLs, por sus siglas en inglés), diseminadas en especies de enterobacterias y *Pseudomonas* [9,11]. Estas enzimas son capaces de hidrolizar tanto penicilinas como los distintos tipos de cefalosporinas y la monobactama aztreonam. Dentro de este grupo se encuentran variantes de las enzimas de clase A: TEM, SHV y CTX-M, así como las variantes de clase D conocidas como OXAs (*oxacillinases*). Por otro lado, también han surgido variantes que son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos.

Resulta entonces crucial preservar los carbapenemes como antibióticos de último recurso para los casos de infecciones graves mediadas por cepas productoras de ESBLs. Sin embargo, en los últimos diez años se han dispersado rápidamente genes que codifican para enzimas carbapenemasas en enterobacterias y Gram-negativos no fermentativos [17,18]. Dentro de estas enzimas carbapenemasas se destacan, la β -lactamasa de clase A KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*), las de clase D OXAs y las MBLs [17].

Las MBLs, a diferencia de las SBLs, son todas capaces de hidrolizar carbapenemes y no existe al momento un inhibidor de uso clínico contra las mismas [19]. Las primeras metalo- β -lactamasas descritas fueron encontradas en bacterias ambientales y patógenos oportunistas, y

son de codificación cromosómica, como BclI de *Bacillus cereus* [20], GOB-1 de *Elizabethkingia meningoseptica* [21] y L1 de *Stenotrophomonas maltophilia* [22]. En cambio, las MBLs codificadas en elementos genéticos móviles han mostrado un alarmante aumento en su ocurrencia en bacterias de relevancia clínica, mayormente patógenos oportunistas Gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* [17–19]. Tal es el caso de las variantes VIM (*Verona Integrated Metallo- β -lactamase*) [23] e IMP (*Imipenemase*) [24]. En 2008 se identificó una nueva MBL, denominada NDM (*New Delhi Metallo- β -lactamase*), en un paciente sueco que había adquirido la infección en India [25]. A partir de allí, el gen de NDM se dispersó rápidamente por todo el mundo en cepas de *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram-negativos no fermentativos y *Vibrionaceae*, mediante la transmisión de diversos plásmidos en forma inter-cepa, inter-especie e inter-género [26]. El gen de NDM se ha encontrado incluso en bacterias presentes tanto en agua potable como en agua de desecho en India, lo cual indica que la transmisión de este gen ha sobrepasado las barreras hospitalarias [27].

La principal preocupación que generan las MBLs deviene de su amplio espectro de sustrato, que incluye las generaciones más nuevas de cefalosporinas y carbapenemes [28]. Por otro lado, si bien no son capaces de hidrolizar el antibiótico β -lactámico aztreonam [29], las SBLs que en general se coexpresan con las MBLs disminuyen la sensibilidad de las cepas a dicho compuesto [11].

Los elementos genéticos móviles que contienen los genes de las carbapenemasas en general también presentan genes de resistencia a aminoglicósidos y quinolonas, dando lugar a cepas multi-resistentes. Esto deja como únicas opciones de tratamiento los antibióticos tigeciclina y colistina, que no siempre funcionan y, en el caso de colistina, posee una elevada nefrotoxicidad [30].

La situación actual de la resistencia bacteriana es tan delicada que diversos autores anticipan una era post-antibiótica [31]. Sin antibióticos disponibles, todo el sistema médico actual entraría en crisis, dado que incluso una simple cirugía podría poner en riesgo la vida del paciente [30,31]. Para el control de la resistencia bacteriana resulta crucial el funcionamiento de los sistemas de monitoreo de cepas resistentes en la clínica y la concientización en el uso racional de los antibióticos [30]. La investigación en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, incluyendo nuevos blancos de acción, es uno de los pilares para evitar una era post-antibiótica [13]. Otro de

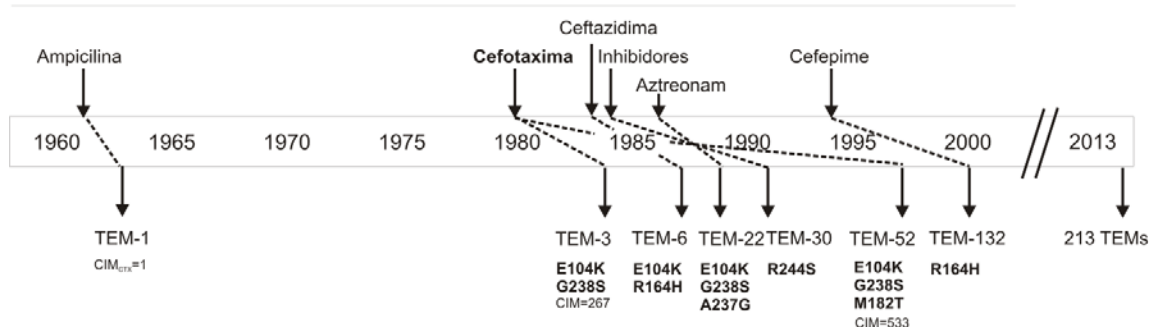
los pilares se base en estudiar los mecanismos de resistencia desde una perspectiva evolutiva, de manera de contar con herramientas para anticiparse a la rápida evolución de los mismos [32].

1.4 Evolución de los mecanismos de resistencia: el caso de la β -lactamasa TEM

La SBL TEM-1 fue aislada como un determinante plasmídico de resistencia a ampicilina en 1963. En 1976, esta enzima se utilizó como modelo para demostrar por primera vez que una sustitución aminoacídica puede alterar el fenotipo de resistencia [33]. Luego de la introducción de las cefalosporinas de tercera generación (como cefotaxima y ceftazidima) a principios de los '80, empezaron a aislarse variantes de TEM-1 con diferencias puntuales en algunas posiciones de la secuencia de aminoácidos. En la Figura 2 se muestra un esquema de la relación temporal entre la introducción de nuevos antibióticos y la aparición de variantes capaces de hidrolizarlos [34].

Con el gran número de variantes aisladas de la familia TEM (217 en febrero de 2014) se constituyó una base de datos de sustituciones aminoacídicas [35] que pueden relacionarse con las alteraciones fenotípicas encontradas [36]. A su vez, se ha buscado correlacionar estas alteraciones fenotípicas con modificaciones estructurales y catalíticas en la enzima debido a dichas sustituciones [37]. De esta manera, la enzima TEM-1 ha servido como sistema modelo para el estudio de la relación estructura-función en enzimas, la evolución *in vitro* de la resistencia a antibióticos [38,39] y para responder varias preguntas fundamentales respecto a la evolución de proteínas. Entre estas cuestiones se ha estudiado el fenómeno de epistasis o interacción entre mutaciones, que implica que el efecto fenotípico de una mutación depende de la ausencia o presencia de otra y cómo dicho fenómeno puede condicionar los caminos evolutivos posibles hacia distintas variantes [40,41].

Evolución natural



Evolución dirigida

Cefotaxima

1994-Stemmer *et. al*
ADN ShufflingE104K
G238S
M182T
A18V
CIM= 16.000E104K
G238S
M182T
A42G
G92S
R241H
CIM 32.0001999-Zaccolo *et al.*
Análogos de ADNR164S
E104K
CIM=3,1252000-Orencia *et al.*
Cepa mutagénciaE104K
G238S
M182T
CIM=800E104K
EG238S
M182T
CIM=500

Figura 2: Esquema representativo de la evolución natural de la β -lactamasa TEM-1 en paralelo a la introducción de nuevos antibióticos β -lactámicos y de las variantes obtenidas mediante Evolución Molecular Dirigida.

En el esquema de la Evolución natural se indica el momento de introducción de un nuevo antibiótico β -lactámico en la clínica y el de aparición de la variante TEM con capacidad de conferir resistencia contra el mismo. Debajo de cada variante se indican las mutaciones responsables del fenotipo. En el esquema de Evolución dirigida se muestran los resultados de tres trabajos realizados por selección con cefotaxima. Las CIMs mostradas en todos los casos corresponden a cefotaxima. Esquema adaptado de [34].

El estudio de la evolución de la resistencia frente a cefotaxima constituye el ejemplo de alteración de especificidad de sustrato más estudiado con la enzima TEM-1. Diversas estrategias de Evolución Molecular Dirigida se han empleado para obtener variantes de TEM optimizadas contra dicho sustrato [34,42,43]. Estas estrategias consisten en emplear un método de mutagénesis al azar para obtener un banco de clones mutantes y un sistema de selección, en este caso, por resistencia. En 1994, el grupo de Stemmer obtuvo una variante de la enzima TEM con resistencia aumentada alrededor de 30.000 veces [42]. Esta variante presenta tres mutaciones (E104K, G238S y M182T) que también se han sido seleccionadas naturalmente en las variantes clínica, como se indica en la Figura 2. En forma concomitante, otros experimentos de Evolución Molecular Dirigida han generado esas mismas mutaciones [41,44]. Por simplicidad, en la Figura 2 sólo se muestran los casos más sobresalientes, pero existen otros experimentos de evolución *in vitro* a partir de TEM-1, incluso contra otros sustratos [38] o combinaciones de sustrato e inhibidores [45,46], que también han mostrado concordancia con mutaciones ocurridas en las

variantes clínicas. Por lo tanto, existe evidencia sólida que demuestra la utilidad de los experimentos de Evolución Molecular Dirigida y el análisis posterior de las mutaciones encontradas como herramienta predictiva para anticiparse a la rápida evolución de los mecanismos de resistencia.

1.5 Evolución de las metalo- β -lactamasas

1.5.1 Metalo- β -lactamasas y superfamilia: características comunes y particularidades de la actividad lactamasa

Las MBLs son miembros de una superfamilia ancestral de metaloenzimas que incluye también una extensa variedad de hidrolasas, entre ellas: la glioxalasa II de *Homo sapiens*, la fosfodiesterasa de *E. coli*, la paration hidrolasa de *Pseudomonas sp.*, la N-acil homoserin lactona hidrolasa de *Bacillus thuringiensis* y la ADN nucleasa Artemis de *H. sapiens*. Además, incluye un grupo de proteínas redox citosólicas, como la Rubredoxina: Oxígeno Oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* [47]. La topología común en esta superfamilia es un plegamiento de tipo sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$, donde el sitio activo se encuentra situado en un hueco poco profundo en la interfaz de los dos dominos $\alpha\beta$ (Figura 3) [28,48]. Para facilitar la comparación de los residuos en la superfamilia de MBLs, se construyó un esquema de numeración estándar denominado “BBL” [49,50] en base a alineamientos de secuencia y estructurales, que será el empleado en el presente trabajo de Tesis.

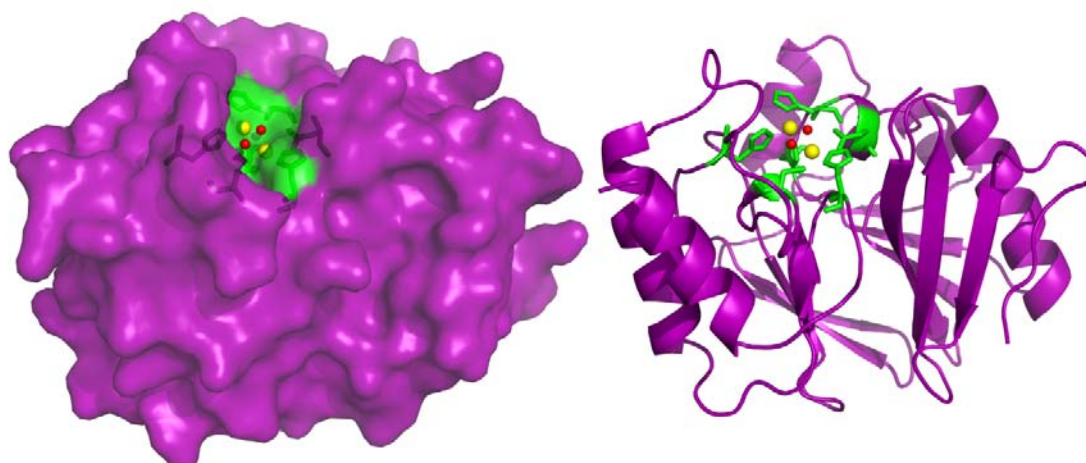


Figura 3: Estructura cristalográfica de la MBL BclI de *Bacillus cereus*.

Se muestra la estructura de BclI (PDB 1BC2 [51]) como superficie (izquierda) y como cintas marcando los elementos de estructura secundaria (derecha). En el sitio activo se muestran en verde los residuos ligandos de Zn(II), como esferas amarillas los iones Zn(II) y como esferas rojas las moléculas de H₂O.

La mayoría de los 6000 miembros de esta superfamilia comparten cinco motivos conservados: D84, H116-X-H118-X-D120-H121, H196, D221, H263 (en donde X representa un aminoácido no conservado). Excepto por el residuo D84, todos los demás motivos están involucrados en la coordinación del metal [47]. Las hidrolasas no β -lactamasas presentan generalmente sitios dinucleares de Zn(II), Fe(II)/Fe(III) o Mn(II) con un residuo de Asp/Glu que une a puente ambos metales. La mayoría de los miembros de la superfamilia comparten un primer sitio metálico (sitio 1 ó Zn1 para las MBLs) compuesto por los residuos His116, His118 e His196 y un segundo sitio metálico (sitio 2 ó Zn2 para las MBLs) compuesto por los residuos Asp120, His121 y His263 (Figura 4)[47]. Una de las mayores diferencias entre las MBLs y los demás miembros de la superfamilia es la presencia en esta últimas de un ligando a puente Asp221. En cambio, las MBLs presentan en dicha posición un residuo de Cys, que actúa como ligando del Zn(II) en el sitio Zn2, o un residuo de Ser que no actúa como ligando.

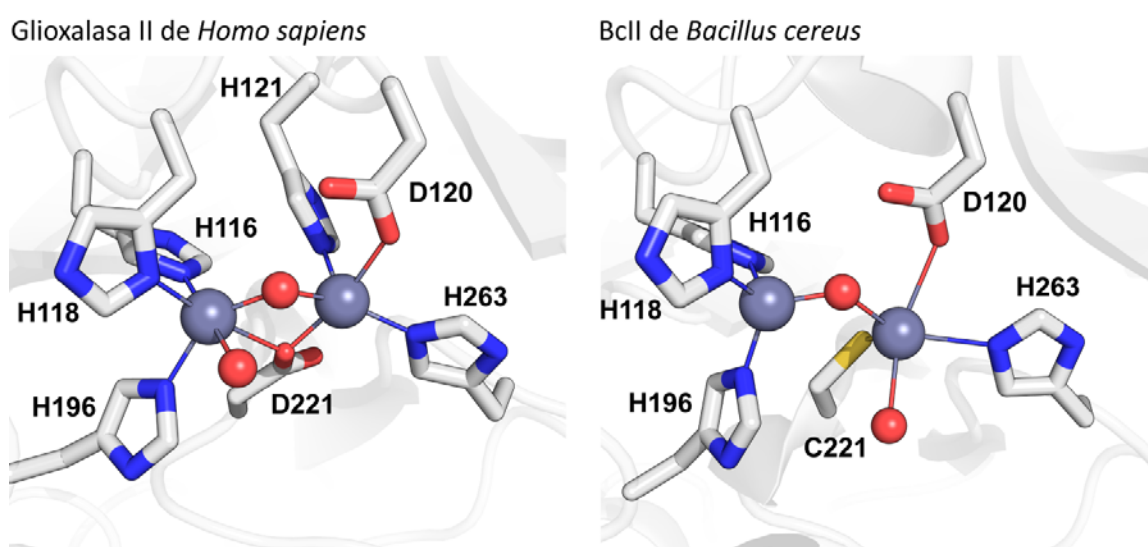


Figura 4: Características conservadas del sitio activo dentro de las proteínas de la superfamilia de MBLs y diferencias con las enzimas MBLs.

Las esferas grises corresponden a los iones Zn(II) y las esferas rojas a moléculas de agua. Se muestran como bastones los residuos ligandos de los iones Zn(II). A la izquierda se muestra el sitio activo de la enzima glioxalasa II de *Homo sapiens* (PDB 1Q5) [52], característico de los miembros de la superfamilia. A la derecha se muestra el sitio de la MBL BcII de *B. cereus* (PDB 1BC2)[51], característico de las MBLs de tipo B1. El sitio Zn1 es compartido con los demás miembros de la superfamilia; mientras que el sitio Zn2 se encuentra modificado debido a la presencia de un residuo de Cys en lugar de un residuo de Asp en la posición 221.

Las MBLs, que constituyen la clase B de β -lactamasas, se dividen en tres subclases: B1, B2 y B3, en base a alineamientos de secuencia. Las enzimas de subclases B1 (como BcII, IMP, VIM y NDM) y B3 tienen el potencial de unir dos iones Zn(II) en su sitio activo [53–57]. Estas enzimas son

de amplio espectro de sustrato, dado que presentan actividad contra las distintas clases de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. En cambio, las de subclase B2 son activas con un solo ión Zn(II) en el sitio activo (en el sitio Zn_2) y son carbapenemasas exclusivas [58]. A partir del análisis filogenético, las MBLs se pueden clasificar en dos grupos de origen evolutivo diferente: B1 y B2 por un lado, y B3 por el otro [59]. Una característica peculiar del sitio activo en el grupo B1 + B2 es que en la posición 221 se encuentra un residuo de Cys en lugar del residuo de Asp conservado en la superfamilia [47] (Figura 4). Dicho residuo de Cys actúa como ligando del ión Zn(II) del sitio Zn_2 en lugar del residuo conservado H121 (Figura 4). Este hecho resulta llamativo dado que los residuos de Cys son de alta ocurrencia en sitios estructurales de Zn(II) pero se encuentran muy raramente en sitios catalíticos de Zn(II) [60].

La presencia de dicho residuo de Cys como ligando del ión Zn(II) sugiere que el mismo ha sido fijado en el ancestro común de las enzimas B1 y B2 por cumplir un rol esencial en su función β -lactamasa. Este punto de divergencia en la evolución de las MBLs de relevancia clínica respecto a la superfamilia fue abordado durante la Tesis del Dr. Javier M. González [61]. En dicho trabajo se estudió la mutante C221D de la enzima BclI de *Bacillus cereus*. Se observó que la mutante posee un perfil hidrolítico *in vitro* análogo al de la enzima silvestre y, sin embargo, presenta una capacidad de conferir resistencia a células de *E.coli* notablemente disminuida. En el Capítulo 3 del presente trabajo de Tesis nos proponemos explicar la razón de este fenómeno, iniciando así la búsqueda de correlaciones entre factores moleculares de las MBLs y el fenotipo de resistencia.

1.5.2 Evolución de las MBLs ante la presión de selección contra nuevos sustratos

Las MBLs de mayor relevancia clínica pertenecen a la subclase B1, siendo las de tipo IMP y VIM las que presentan mayor número de variantes (48 y 41 respectivamente hasta el momento [62]). Las variantes IMP presentan mutaciones puntuales que dan lugar a cambios en el perfil de sustrato [63,64], de forma similar a lo previamente descrito con la lactamasa TEM. Si bien se ha especulado sobre los efectos que podrían tener estas mutaciones, su relación con los cambios en el perfil de sustrato aún no se comprende por completo. La variante IMP-1 difiere de la variante IMP-6 en la posición 262 por una sustitución de Gly (IMP-6) \rightarrow Ser (IMP-1). IMP-1 hidroliza más eficientemente penicilinas e imipenem que IMP-6, lo cual se ha visto reflejado en un aumento en su capacidad de conferir resistencia a dichos sustratos. Esto ha llevado a sugerir que IMP-6 sería un precursor de IMP-1, y que IMP-1 habría evolucionado como resultado de la presión de selección en la clínica [65,66]. Por otro lado, se ha visto que IMP-6 confiere mayores niveles de

resistencia contra carbapenemes más nuevos, como meropenem y doripenem. Esto deriva en la hipótesis opuesta: que IMP-6 habría evolucionado a partir de IMP-1 debido a la introducción de estos carbapenemes, sacrificando su actividad contra penicilinas e imipenem [64]. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación contundente entre la actividad enzimática de IMP-6 contra meropenem y doripenem y los datos de resistencia [67].

Buscando un paralelismo con los estudios en la enzima TEM, se han realizado intentos de Evolución Molecular Dirigida con IMP-1 contra el antibiótico imipenem. Dado que no se encontraron variantes con resistencia aumentada, se concluyó que IMP-1 no tendría el potencial de seguir evolucionando. Sin embargo, esta conclusión debe ser tomada con precaución, dado que los experimentos se llevaron a cabo en cepas de *E.coli* de laboratorio [68]. Se ha visto que en general estas cepas son muy sensibles a imipenem y las MBLs no pueden conferirles los altos niveles de resistencia que sí se han encontrado en cepas clínicas [63].

En resumen, los datos previos en MBLs nos indican la factibilidad de que mutaciones puntuales modifiquen el perfil de sustrato, aunque la información disponible no permite hacer correlaciones directas entre las características moleculares de las enzimas y el fenotipo de resistencia.

En nuestro grupo de trabajo, durante la Tesis del Dr. Pablo E. Tomatis, se empleó una estrategia de Evolución Molecular Dirigida sobre la MBL BclI de *B. cereus* [69,70]. La selección se realizó contra una cefalosporina para la cual la enzima presenta muy baja actividad, cefalexina. Como resultado final se obtuvo una variante que posee una resistencia aumentada 32 veces frente a este antibiótico, demostrando así que las MBLs poseen el potencial para seguir evolucionando contra sustratos pobres. Este cambio tuvo lugar a través de cuatro sustituciones, siendo una de ellas G262S, la misma sustitución que diferencia a las variantes IMP-6 e IMP-1.

En el Capítulo 4 del presente trabajo de Tesis se analizarán los efectos fenotípicos de cada una de las mutaciones encontradas en este experimento y sus posibles combinaciones, realizando el análisis en el contexto de los conceptos de evolución de proteínas: interacción entre mutaciones (epistasis), caminos evolutivos y “paisaje de aptitud”. En el Capítulo 5 se analizará la correlación entre los efectos de las mutaciones sobre propiedades moleculares de la enzima y los efectos en el fenotipo de resistencia.

1.6 Objetivos de esta Tesis

A lo largo de la historia, desde la implementación masiva de antibióticos para combatir infecciones bacterianas, se ha visto en forma reiterada que las bacterias pueden afrontar la introducción de nuevos antibióticos mediante la rápida evolución de sus mecanismos de resistencia. En el caso de la resistencia a antibióticos β -lactámicos mediada por enzimas β -lactamasas, unos pocos cambios de secuencia pueden dar lugar a cambios en el perfil de hidrolítico. Dentro de las β -lactamasas, las MBLs representan una grave amenaza clínica debido a su amplio espectro de sustrato, que incluye las cefalosporinas más nuevas y los carbapenemes. A esto se suma la ausencia de inhibidores de uso clínica contra las mismas.

En esta Tesis nos propusimos explorar las características moleculares que están bajo presión de selección en la evolución de las MBLs. De esta manera buscamos contar con herramientas que permitan analizar, comprender y anticipar las rutas evolutivas de las MBLs. Nos planteamos entonces los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar por qué el residuo de Asp conservado en la superfamilia de MBLs en la posición 221 ha sido reemplazado por un residuo de Cys como ligando del Zn(II) en las MBLs de relevancia clínica. Se estudiarán los factores que podrían estar relacionados con la disminución de la funcionalidad *in vivo* de la mutante C221D: niveles de expresión en extractos periplasmáticos, actividad en extractos periplasmáticos y dependencia de dicha actividad con la disponibilidad de Zn(II).
- 2) Estudiar los caminos evolutivos posibles hacia una variante optimizada de BclI con cuatro mutaciones: G262S, L250S, V112A y N70S; de manera de responder a cuestiones fundamentales en la evolución de proteínas acerca de la relevancia de la interacciones entre mutaciones en el condicionamiento de los caminos evolutivos posibles. Esto implica construir las variantes para cada paso de todos los caminos y determinar el fenotipo de resistencia correspondiente.
- 3) En base a la variante optimizada de BclI y a las variantes correspondientes a puntos intermedios de estos caminos evolutivos, se buscará correlacionar características de las enzimas, como actividad, estabilidad y comportamiento diferencial respecto a la disponibilidad de Zn(II) en el medio, con los fenotipos de resistencia observados.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Plásmidos

2.1.1 Plásmido pKP

En el laboratorio se disponía de un plásmido derivado del vector pBluescriptKS(+) denominado pKP-BclI que permite la expresión de la proteína BclI y su translocación al espacio periplasmático de *E.coli* [70]. El plásmido pKP-BclI mantiene el origen de replicación del plásmido pBluescriptKS(+) (de número de copias entre 300 y 500) y contiene un marcador de resistencia a kanamicina. El gen codificante para la enzima BclI está clonado bajo control del promotor inducible pLac y fusionado a la secuencia codificante para el péptido señal de la enzima pectato liasa (*pelB*) de *Erwinia carotovora*. Este péptido señal permite la exportación de la proteína hacia el periplasma, donde puede unirse a los antibióticos β -lactámicos e hidrolizarlos confiriendo así resistencia contra los mismos.

Este plásmido se tomó como base para clonar las distintas mutantes de BclI con las cuales se trabajó en esta Tesis utilizando los sitios de restricción BamHI y XhoI.

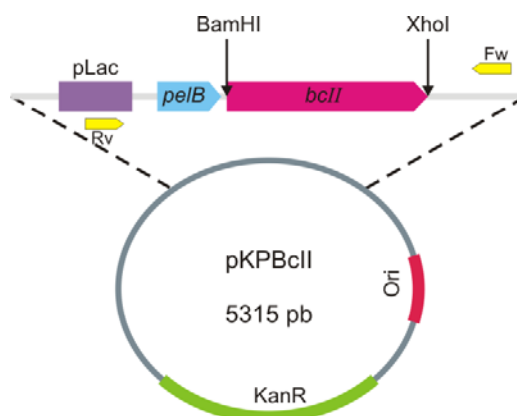


Figura 5: Diagrama del vector pKP-BclI.

Se indican sus componentes más importantes: pLac, promotor inducible por IPTG; *pelB*, secuencia codificante para el péptido señal de Pectato Liasa; gen codificante de BclI; cebadores M13Fw y M13Rv utilizados para secuenciar las construcciones realizadas en este vector, KanR, *cassette* de resistencia a Kanamicina; Ori: origen de replicación ColE1.

2.1.2 Plásmido pET-Term

Este plásmido fue construido en nuestro laboratorio a partir del vector pETGEXCT [71]. El vector pETGEXCT posee un promotor específico para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 mediante el cual se pueden sobreexpresar proteínas como fusión N-terminal o C-terminal a la proteína Glutación-S-Transferasa (GST, proveniente de *Schistosoma japonicum*). Esto permite aislar la fusión del extracto crudo mediante cromatografía de afinidad por GST. En el vector pET-Term se introdujo corriente abajo del gen *gst*, la secuencia del gen *bclI* y la secuencia del elemento β -Term proveniente del genoma de *B. cereus*. Esta secuencia actúa como un terminador de la transcripción del gen *bclI*, y su presencia resulta esencial para obtener niveles elevados de transcripción de la proteína de fusión GST-BclI [72]. El plásmido contiene un marcador de resistencia a ampicilina. Las distintas mutantes de BclI se clonaron en este vector mediante los sitios de restricción BamHI y HindIII.

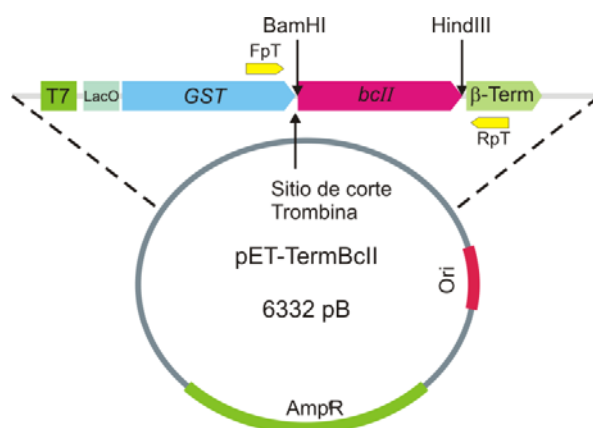


Figura 6: Diagrama del vector pET-Term BclI.

Se indican sus componentes más importantes: promotor T7; operador lacO; GST, gen codificante para Glutación-S-Transferasa de *Schistosoma japonicum*; sitio de corte con Trombina; gen codificante de BclI; cebadores FpT y RpT utilizados para secuenciar las construcciones realizadas en este vector, AmpR, cassette de resistencia a ampicilina; Ori: origen de replicación pMB1.

2.2 Soluciones amortiguadoras

- TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.
- MTPBS: NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 16 mM, NaH₂PO₄ 4 mM, pH 7.
- Tris-Zn: Tris-HCl 100 mM, pH 7, ZnSO₄ 1 mM.
- Solución amortiguadora para medios de reacción: Hepes 10 mM; NaCl 200 mM; pH 7,5.
- Solución amortiguadora para determinaciones de afinidad: MOPS 50 mM; NaCl 0,1 M; pH 7,3.

2.3 Medios de cultivo

- Medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB): triptona de caseína 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V (Sigma).
- Medio de cultivo sólido Luria-Bertani (LB): triptona de caseína 1% P/V, extracto de levadura 0,5% P/V, NaCl 1% P/V, agar-agar 1,5% P/V (Sigma).
- Medio SOC: peptona de carne 2%, extracto de levadura 0,5%, KCl 2,5 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y Glucosa 20 mM.

Cuando se utilizaron antibióticos como agentes de selección, los medios se suplementaron con las siguientes concentraciones finales: 150 µg/ml para ampicilina, 35 µg/ml para cloranfenicol y 50 µg/ml para kanamicina.

2.4 Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Nombre	Genotipo
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
BL21(DE3) pLysS	F- ompT (rB-mB+) dcm gal (DE3) pLysS CmR

2.5 Técnicas de Biología Molecular

2.5.1 Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se purificó mediante el Método de Lisis Alcalina [73] y los reactivos del Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según indicaciones del fabricante. En general, se obtuvieron rendimientos en el rango de 60-100 ng de ADN plasmídico/µl. El grado de pureza e integridad se chequeó por electroforesis en gel de agarosa según se describe en la 2.5.2. La estimación de las concentraciones de las soluciones de ADN se obtuvo por comparación directa con la intensidad de las bandas del patrón de tamaño molecular (ADN de fago λ digerido con *HindIII*), de concentración conocida (100 ng/µL). Cuando fue necesario, se estimó la concentración espectrofotométricamente, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm con un paso óptico de 1 cm equivale a 50 µg/ml de ADN doble hebra. Se evaluó también la relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, que debería ser igual o mayor que 1.8 para preparaciones puras.

2.5.2 Electroforesis en geles de agarosa

Se llevaron a cabo utilizando sistemas de tipo submarino [73]. Se usaron geles con una concentración de agarosa variable (entre 1 y 2 % P/V), dependiendo del tamaño de las moléculas de ADN a resolver, preparados en la solución amortiguadora TAE. A los mismos se les adicionó el colorante Gel Green (Biotium), que se une al ADN doble hebra, antes de su gelificación a la concentración final indicada por el proveedor. Para la visualización de las bandas se empleó un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen), que permite la excitación de la fluorescencia del colorante que tiene su máximo a 500 nm.

Para sembrar las muestras, se mezclaron previamente con 10 % V/V de una solución de azul de bromofenol 0,25 % P/V; xilenocianol 0,25 % P/V y glicerol 30 % V/V en agua destilada estéril. Las electroforesis fueron realizadas utilizando TAE como solución de corrida, con una diferencia de potencial constante de 80 V. Como marcadores de peso molecular se utilizaron ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Invitrogen) y Ladder 100 pb (Productos Bio-lógicos).

2.5.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las condiciones de digestión utilizadas fueron las recomendadas por el proveedor de las enzimas de restricción (Promega). Las reacciones para cortes de chequeo se realizaron en general en un volumen final de 20 μ l, utilizando 0.3 μ l de enzima (de concentración 10 U/ μ l), 3 μ l de ADN plasmídico (de concentración aproximada 100 ng/ μ l), 2 μ l del medio de reacción 10X correspondiente y 2 μ l de BSA 10 mg/ml. Cuando los cortes se realizaron con fines de clonado, se utilizó típicamente un volumen final de 50 μ l, utilizando 1 μ l de enzima y 10 μ l de ADN plasmídico. En ambos casos se utilizaron incubaciones de 2-3 hs. a 37 °C.

En los casos en que se realizaron digestiones con dos enzimas, cuando fue posible, se empleó un medio de reacción en el que ambas fuesen activas. De lo contrario, se procedió al corte secuencial, el producto obtenido luego del corte con la primera enzima se purificó a partir de un gel de agarosa y se digirió con la segunda enzima.

2.5.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), que se basa en la unión del ADN a una membrana de silica en presencia de sales caotrópicas.

2.5.5 Reacciones de ligación

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Promega). Se usó una concentración molar del fragmento 3 veces mayor a la del vector, para tratar de minimizar la religación del mismo, en un volumen final de 50 µl. Se realizaron controles de religación del vector, sin el agregado de inserto. Las reacciones se llevaron a cabo a 4 °C durante 16hs. En todos los casos se realizaron ligaciones direccionales.

2.5.6 Mutagénesis sitio-dirigida

Para introducir las mutaciones sitio-específicas deseadas se utilizó la técnica denominada Mutagénesis por Amplificación del Vector y Selección de Mutantes por Digestión con DpnI [73]. El protocolo se basa en la utilización de un par de oligonucleótidos totalmente complementarios entre sí, cuya secuencia contiene la mutación deseada, y en la eliminación del ADN parental mediante digestión con DpnI, la cual es específica para ADN metilado.

Los oligonucleótidos hibridan en posiciones equivalentes en hebras opuestas del molde y son extendidos mediante una reacción de PCR con una polimerasa altamente procesiva, en este caso Platinum *Pfx* (Invitrogen). Las hebras producidas pueden asociarse para dar lugar a un plásmido mellado. Una vez terminada la reacción de amplificación se digiere el ADN parental metilado mediante el uso de la enzima de restricción DpnI. Los productos de la digestión se transforman en células de *E.coli*, donde los plásmidos mellados pueden religarse y replicarse.

2.5.6.1 Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos

La secuencia de los cebadores utilizados se diseñó para introducir el cambio deseado y, cuando fue posible, para incorporar mutaciones silenciosas adicionales que generan un sitio de corte para una enzima de restricción como marcador. A continuación se detallan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Los codones cambiados y los sitios de restricción creados están subrayados, y las bases mutagenizadas se marcan en rojo.

L250S:

Fw: 5'-GGTCTACATCGATTGAGAATGTGTCGAAGCGATATAGAAATATAAATGC-3'

Rv: 5'-GCATTATATTTCTATATCGCTTGACACATTCTCAATCGATGTAGACC-3'

V112A:

Fw: 5'-GCGTAACGGATGCCATTATTACACATGCGCATGCTGATCGAATTGG-3' - Sitio SphI

Rv: 5'-CCAATTCGATCAGCATGCGCATGTGTAATAATGGCATCCGTTACGC-3

Se contaba con los genes mutantes de BclI con las mutaciones G262S, N70S y G262S/N70S. Se partió de los genes de BclI silvestre (wt) y de dichas mutantes para adicionar la mutación V112A y obtener las siguientes combinaciones de mutaciones: V112A, G262S/V112A, V112A/N70S y G262S/V112A/N70S.

Luego, contando con estas variantes, se adicionó la mutación L250S para obtener las combinaciones: L250S, L250S/N70S, G262S/L250S/N70S, L250S/V112A.

Las mutagénesis se realizaron sobre el plásmido pKP, y se procedió luego al reclonado en dicho plásmido con las enzimas de restricción BamHI y XhoI. En forma similar, se precedió con el plásmido pET-Term, realizando el reclonado con las enzimas BamHI y HindIII.

2.5.6.2 Reacción de PCR y digestión con DpnI

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100 µl conteniendo 0.3 mM de cada dNTP, 0.2 nmol/µl de cada oligonucleótido, MgSO₄ 1 mM, 400 ng del plásmido molde, 10 µl de la solución amortiguadora 10X correspondiente a la polimerasa Pfx Platinum DNA (Invitrogen) y 2 U de dicha enzima y cantidad suficiente de agua MilliQ.

Se utilizó el equipo Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, luego de un paso inicial de 30 s a 95°C se realizaron 18 ciclos de: 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y un paso de extensión final de 5 min a 68°C. El ADN parental se digirió agregando a la mezcla de reacción 1 U de DpnI e incubando 1 h a 37°C.

2.5.6.3 Recuperación de plásmidos mutantes

Se realizó una transformación con CaCl₂ de *E. coli* DH5α o JM109 utilizando toda la mezcla de reacción el ADN tratada con DpnI. Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico de colonias de transformantes seleccionadas al azar. La presencia de las mutaciones esperadas se infirió por patrones de restricción cuando fue posible y se confirmó mediante secuenciación realizada por el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Maine (Orono, ME, Estados Unidos).

Para los genes clonados en el plásmido pKP (Figura 5) se utilizaron los oligonucleótidos universales M13-Foward y M13-Reverse. Estos cebadores hibridan en lados opuestos del sitio de múltiple clonado del plásmido, permitiendo obtener la secuencia completa de los fragmentos clonados. Para los genes clonados en el plásmido pET-Term (Figura 6) se utilizaron los

oligonucleótidos pT Fw (CCA CAA ATT GAT AAG TAC TTG AAA TC) y pT Rv (CTC AGT AAT ATA TGC TGG CGT AAT C), los cuales hibridan en posiciones opuestas por fuera de la secuencia codificante del gen *bclI*. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Clustal X versión 2.0.8 [74] para verificar que las mismas correspondiesen con lo esperado.

2.5.7 Preparación y transformación de células de *E. coli* utilizando CaCl_2

Este método se empleó para transformar células de *E. coli* tanto con ADN plasmídico como con mezclas de ligación o mutagénesis [73]. Se inoculó una colonia en medio líquido LB (suplementado con cloranfenicol para BL21 (DE3) pLysS) y se creció a 37 °C durante 16 h con agitación. Se realizó una dilución 1:100 del cultivo saturado en medio LB (suplementado con el antibiótico correspondiente según el plásmido a transformar), y se lo dejó crecer a 37 °C durante hasta alcanzar una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de aproximadamente 0,4.

A continuación, se fraccionó el cultivo en alícuotas de 1 ml por cada evento de transformación a realizar. Los tubos se centrifugaron durante 2 min a 4000 rpm en centrífuga refrigerada a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes, y las células se resuspendieron en 500 μl de CaCl_2 0,1 M frío. Se centrifugaron nuevamente las células bajo las mismas condiciones, y se resuspendieron en 100 μl de CaCl_2 0,1 M frío. Luego, se adicionó a las células 2 μl de plásmido superenrollado concentrado (al menos 50 ng/ μl), o de una dilución 1/5 de la mezcla de ligación. En el caso de mezclas de reacción de mutagénesis, se le adicionó CaCl_2 a la mezcla para una concentración final de 0,1M y con esta solución se resuspendieron las células en el paso final. En todos los casos, se incubó en hielo durante 1 h. Después se les aplicó un choque térmico de 2 min a 42 °C, y se las incubó durante 1 h a 37 °C en medio SOC con agitación para permitir su recuperación. Finalmente, las células se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico al cual confiere resistencia el plásmido transformado (además de cloranfenicol en el caso de BL21 (DE3) pLysS) y se crecieron durante 16 hs a 37 °C. Como control negativo se siguieron los mismos pasos, sin el agregado de ADN plasmídico.

2.6 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, con una concentración de poliacrilamida 12 o 14 % P/V para el gel de separación (12 o 14 % P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8 en Tris:HCl 0,126 M pH 8,8; SDS 0,26 % P/V) y 4,5 % P/V para el gel

de concentración (4,5 % P/V de Acrilamida-Bisacrilamida 30:0,8 % P/V en Tris:HCl 0,126 M pH 6,8, SDS 0,26 % P/V) [75]. Las muestras de proteína fueron incubadas en solución de siembra (glicerol 5% V/V, SDS 2% P/V, β -mercaptoetanol 0,1 % V/V, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) durante 5 min a 100 °C y posteriormente centrifugadas 5 min a 13000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente.

El sistema de electroforesis empleado fue el Miniprotean III (BioRad). La corrida electroforética se realizó utilizando como solución amortiguadora Tris 0,3 % P/V, glicina 1,44 % P/V, y SDS 0,1 % P/V, aplicando una corriente constante de 30 mA. Luego de la corrida, los geles fueron fijados durante 10 minutos con una solución de etanol: ácido acético: agua (25:10:75), y teñidos durante 10 minutos con una solución de azul de Coomassie R250 al 1% (P/V) en etanol: ácido acético: agua (50:10:40). La decoloración del gel se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con etanol: ácido acético: agua (25:10:75).

2.7 Preparación de extractos de periplasma y de células totales

Las preparaciones de extractos de periplasma se realizaron con el fin de poder medir la actividad β -lactamasa en dicho medio. En el laboratorio se contaba con experiencia en el uso de un protocolo de extracción por choque osmótico descrito previamente [76], el cual se modificó para evitar el uso de EDTA, dado que el mismo es un fuerte quelante de Zn(II), que alteraría el estado de la enzima. Brevemente, se inocularon colonias de *E.coli* XL1-Blue transformadas con los plásmidos pKP, pKP-BcII-wt o pKP con cada una de las mutantes estudiada, en 10 ml de medio líquido LB suplementado con kanamicina. Estos cultivos se crecieron con agitación durante 16 h a 37 °C. A continuación se realizaron diluciones 1/100 de cada cultivo en 10 ml de medio líquido LB suplementado con kanamicina. Cada cultivo se creció hasta alcanzar una densidad óptica $DO_{600nm}=0,2$; tras lo cual fueron inducidos con IPTG y se continuó su crecimiento hasta alcanzar la fase exponencial a una DO_{600nm} de 0,6-0,8. Luego, se cosecharon las células por centrifugación a 5000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de solución amortiguadora Tris 30 mM (pH 8,0), PMSF 1 mM y sacarosa al 20 %, y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente con agitación. Estas muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, el pellet se resuspendió en 2 ml de $MgSO_4$ 10 mM frío, y se incubó durante 10 min a 4 °C con agitación. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 min para obtener en el sobrenadante las proteínas solubles del periplasma.

Con estas muestras en 2 ml de volumen final fue posible realizar medidas de velocidades iniciales empleando una dilución final 1/20 en el medio de reacción (Hepes 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5). Para visualizar las bandas en geles SDS-PAGE, fue necesario concentrar las muestras. Para ello, 1 ml de las muestras fueron precipitadas con TCA al 10 %, lavadas dos veces con agua y resuspendidas en 30 μ l de una solución de Tris:HCl 50 mM pH 7. Dado que en los ensayos de Western Blot se observó que la precipitación con TCA producía interferencias en el revelado, se probó como alternativa concentrar las muestras en filtros Amicon Ultra con un corte de peso molecular de 10 kDa, logrando concentrar las muestras hasta 20 veces.

En el laboratorio, también se contaba con experiencia en el método de extracción de proteínas periplasmáticas con cloroformo [77]. Este método también se probó en el presente trabajo, observando que pueden obtenerse preparaciones con actividad β -lactamasa y con la ventaja de que los extractos se obtienen más concentrados que con el método anterior. Brevemente, se cosecharon las células de 14 ml de cultivo por centrifugación a 7000 rpm, se lavó dos veces con 3 ml de solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7,3; 30 mM $MgCl_2$. Luego se resuspendieron las células en 200 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 7,3; 30 mM $MgCl_2$, y se adicionaron 20 μ l/ml de cloroformo. La mezcla se homogeneizó suavemente y se incubó durante 15 minutos. Se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 6000 rpm, y se recuperaron de los sobrenadantes los extractos de periplasma. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

Para la preparación de muestras de células totales, se tomaron 400 μ L de los mismos cultivos, se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 40 μ L de Tris-HCl 10 mM. Se le adicionó a cada muestra solución de siembra de SDS-PAGE y se las incubó a 100 °C durante 10 minutos.

Todas las preparaciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

2.8 Medidas de actividad empleando extractos periplasmáticos

A partir de los extractos periplasmáticos preparados por el método de choque osmótico pudieron medirse velocidades iniciales contra cefalexina empleando una dilución 1/20 de dichos extractos. Se utilizó una concentración saturante de cefalexina (400 μ M) según los valores de K_M obtenidos para las enzimas purificadas. Las reacciones se llevaron a cabo en solución amortiguadora 10 mM Hepes; pH 7,5; 200 mM NaCl a 30 °C.

La cantidad de enzima presente en los extractos se cuantificó por densitometría a partir de la banda correspondiente en geles SDS-PAGE (para lo cual fue necesario concentrar los extractos, como se describe en la sección 2.7). Como calibración interna, se sembraron cantidades conocidas de la proteína pura. La identidad de la banda se verificó mediante ensayos de *Western Blot*.

Conociendo la cantidad de enzima en los extractos se calculó el parámetro $V_{\text{máx aparente}}/[E]$ para comparar entre todas las variantes (en general se obtuvieron valores de $[E]$ en la reacción de entre 0,9 y 2 nM). Este procedimiento se repitió 3 veces con preparaciones independientes de periplasma.

Luego, trabajando sólo con las variantes G, GL, GV, GN, GLN, GLV, GVN y GLVN se midieron las velocidades iniciales a varias concentraciones de sustratos, para obtener parámetros de k_{cat} y K_M aparentes. Esto fue posible dado que se observó un comportamiento que obedece el modelo de Michaelis-Menten en todos los casos. Estas determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

2.9 Western Blots

Las muestras de proteínas fueron separadas a través de SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 12 ó 14%. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando como medio de transferencia una solución conteniendo Tris 200 mM, glicina 150 mM, SDS 0,03 % P/V y metanol 10% V/V. La transferencia se realizó a 350 mA durante 1 h con agitación en cámara fría, utilizando el sistema MiniProtean II de BioRad. Se confirmó la adecuada transferencia de las proteínas tiñendo la membrana con una solución de Ponceau S (Sigma) al 0,1%. Luego se procedió al bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% P/V y Tween-20 al 0,1% V/V en solución amortiguadora PBS, realizando 4 cambios de la solución separados por períodos de incubación de 10 min.

A continuación, se realizó la detección específica de la proteína mediante incubación con un anticuerpo policlonal anti-BcII-wt de conejo durante 1 h. Luego de una serie de lavados, se agregó un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) y se incubó durante 1 h. El revelado final se realizó mediante la reacción cromogénica catalizada por esta enzima en presencia de los sustratos fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT), en medio Tris 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl_2 5 mM.

2.10 Determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs)

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para los distintos antibióticos se determinaron en medio sólido LB mediante el método de macrodilución en agar. Los antibióticos ensayados fueron cefalexina, cefotaxima y ceftazidima.

Como cepa hospedadora para las determinaciones se utilizó a *E. coli* XL1-Blue. Para ello se transformó con los plásmidos pKP, pKP-BclI-wt o pKP conteniendo los genes correspondientes a las distintas variantes de BclI. Se partió de un inóculo de cada cepa crecido durante toda la noche a 37°C en medio selectivo conteniendo kanamicina 50 µg/ml y se realizó una dilución 1/50 en medio fresco que se dejó crecer hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,2 unidades. Entonces se indujo la expresión de β -lactamasas a partir del plásmido pKP agregando IPTG 500 µM, y se continuó el crecimiento del cultivo hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4-0,5 unidades.

Se realizaron diluciones de este cultivo con DO_{600nm} ajustadas a 0,1 y 0,01 unidades, y se sembraron gotas de aproximadamente 2 µl utilizando un dispositivo multi-inoculador en placas de LB-agar conteniendo 50 µg/ml de kanamicina, IPTG 500 µM y concentraciones del antibiótico β -lactámico en diluciones progresivas siguiendo la escala de potencias enteras de 2 (2^n). Además, se realizaron determinaciones de CIM en placas de medio LB-agar suplementado con $ZnSO_4$ 500µM o con EDTA 5 µM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 hs.

Los valores de CIMs se determinaron a partir de al menos 3 repeticiones independientes. Para los gráficos de correlaciones se utilizaron los promedios y su error estándar correspondiente. Para las tablas y figuras los valores de CIM se muestran en la escala convencional de 2^n (es decir, si el promedio de una CIM fue de 24 µg/ml, se indica como valor de CIM 32 µg/ml).

2.11 Expresión y purificación de enzimas recombinantes

2.11.1 Inducción de la expresión en células de *E. coli*

Se siguieron los pasos del protocolo de sobreexpresión puesto a punto para BclI wt [78]. Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con el plásmido de expresión denominado pET-Term (sección 2.1.2) conteniendo BclI-wt o sus variantes. Obtenida la placa de transformantes, se escogió una colonia y se la reestrió en una nueva placa de Petri con medio LB sólido suplementado con cloranfenicol y ampicilina. Se tomó una colonia aislada y se inocularon 3 ml de medio líquido LB suplementado con cloranfenicol y ampicilina. Se dejó crecer a 37 °C con

agitación a 250 rpm por un período de 8 hs, se tomó 1 ml y se centrifugó 5 min a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con medio líquido LB fresco. Con las células resuspendidas se inoculó un frasco conteniendo 10 ml de medio líquido LB (dilución 1/10) suplementado con cloranfenicol y ampicilina. El cultivo se dejó crecer por 16 hs a 37 °C en agitación a 250 rpm. Luego se centrifugó 10 min a 5000 rpm a 4 °C en centrífuga refrigerada y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 1 ml de medio líquido LB fresco, y el inóculo así obtenido se agregó a 200 ml de medio líquido LB (dilución 1/20) suplementado con cloranfenicol y ampicilina (repartido en dos erlenmeyers de 500ml). Este se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,8 unidades (aproximadamente 1 h).

Para inducir la expresión de la proteína de fusión se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. La inducción se realizó durante 4 hs a 37 °C en agitación a 150 rpm. En estas condiciones, se encontró que para algunas de las mutantes de BclI con las cuales se trabajó en esta Tesis (G, GVN, GLN y GLVN), se obtenían preparaciones de proteína poco estables (con tendencia a precipitar fácilmente) y con un contenido de metal menor a 1,4 equivalentes de Zn(II)/ por molécula de proteína. En el caso de la mutante GLN, se obtenía muy poca cantidad de la proteína en la fracción soluble luego de la ruptura de las células. Se probó entonces realizar la inducción a 20 °C durante 16 hs y agregando $ZnSO_4$ al medio de cultivo 500 μM , lo que permitió solucionar los inconvenientes tanto de solubilidad de la proteína sobreexpresada como del contenido final de Zn(II) y estabilidad de las preparaciones.

2.11.2 Ruptura celular

Los cultivos celulares se centrifugaron por 15 min a 5000 rpm en una centrífuga IEC con rotor de ángulo fijo 877. Se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 10 ml de solución amortiguadora MTPBS suplementada con fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, ADNasa 0,1 mg/l de cultivo y $MgCl_2$ 5 mM. En este medio las células se congelaron a -20 °C. Al otro día, las células se descongelaron y se agregó nuevamente PMSF.

A continuación se rompieron las células mediante sonicación, sometiéndolas a 5 pulsos de 40 Watts (Sonicador Branson modelo 250). Cada pulso se aplicó durante 30 s, a intervalos de 1 min, manteniendo siempre las células en hielo. El lisado obtenido se centrifugó a 45000 rpm por 1 h a 4 °C en una ultracentrífuga refrigerada Optima L90-K Ultracentrifuge (Beckman Coulter). De esta manera se separa la fracción proteica soluble (extracto crudo) de los restos celulares, células que hayan quedado sin romper y proteínas no solubles.

2.11.3 Separaciones cromatográficas

Para purificar la proteína de fusión GST-BcII (wt o sus variantes) a partir del extracto crudo, se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad. Para ello, se utilizó una columna de vidrio en la cual se empaquetó la matriz comercial Glutación-Agarosa (Sigma), según las indicaciones del fabricante. Una vez equilibrada con 5 volúmenes de MTPBS, se sembró el extracto crudo a reflujo por un período de 16 hs, a 0,5 ml/min. Luego se prosiguió con dos lavados, el primero con 5 volúmenes de MTPBS, y el segundo con 4 volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8, a un flujo constante de 2 ml/min. La proteína de fusión se eluyó con una solución hecha en el momento de glutatión reducido 10 mM en Tris HCl 50 mM pH 8. Una vez seleccionadas las fracciones correspondientes al pico del cromatograma (Abs_{280nm} vs. t), se determinó la cantidad aproximada de proteína de fusión obtenida mediante medidas de absorbancia a 280 nm (el coeficiente de absorción a 280 nm utilizado fue de $1,9 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Todos los pasos cromatográficos se realizaron a 4 °C y se utilizaron bombas del tipo peristáltica, un detector UV-vis, un registrador y un colector de fracciones (Amersham Pharmacia).

La digestión de la proteína de fusión se realizó durante 2 hs a 26° C en el medio de elusión con el agregado de NaCl 150 mM, CaCl_2 2,5 mM (concentraciones finales) y 1 mg Trombina por cada 30 mg de fusión. Se verificó que la totalidad de la proteína fuera digerida en un gel de SDS-PAGE al 14 % P/V.

Para separar la enzima BcII de la proteína GST de se empleó una columna de intercambio catiónico, utilizando la resina comercial *Carboxymethyl Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare). Dicha separación se basa en la diferencia en los puntos isoeléctricos de ambas proteínas (8,3 para BcII-Zn0 y 6,1 para GST). La mezcla de digestión se diluyó 1:3 en Tris-Zn y se sembró a un flujo de 1 ml/min. Se lavó por 16 hs con 50 volúmenes de solución Tris-Zn y luego se eluyó con Tris-Zn, NaCl 400 mM. Se colectaron las fracciones que contenían proteína y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se juntaron aquellas fracciones que contenían la proteína de interés sin impurezas y se determinó la concentración de proteína por medidas de absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de absorción molar de BcII-wt ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [79].

La proteína purificada se concentró hasta un volumen final de aproximadamente 2-5 ml resultando en concentración de aproximadamente 60-80 μM ; mediante el protocolo descrito en sección 2.11.6, y se la dializó contra cien volúmenes de solución amortiguadora Hepes 10 mM,

NaCl 0,2 M, pH 7,5 para eliminar el exceso de zinc (se realizaron cuatro cambios de 12 hs cada uno, a 4 °C).

2.11.4 Cuantificación de enzimas

Se realizaron barridos espectrales entre 350 y 240 nm (en un espectrofotómetro Jasco V-550 o Jasco V-670) de la solución de enzima y de un blanco de solución amortiguadora. Se restaron los espectros y, con el valor de absorbancia diferencial a 280 nm, se calculó la concentración de enzima según la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de absortividad molar utilizado fue el de la enzima silvestre ($\epsilon_{280\text{nm}} = 30.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.11.5 Preparación de apo-enzimas

Para obtener muestras de apo-enzimas de BclI o de sus variantes mutantes se procedió como se describió previamente [78]. Una fracción de la muestra de proteína purificada se sometió a dos pasos de diálisis contra 200 volúmenes de una solución de HEPES 10mM pH 7,5, NaCl 200 mM y el quelante EDTA 20 mM. Luego se eliminó el EDTA mediante dos pasos de diálisis contra 200 volúmenes de una solución de Hepes 10 mM pH 7,5, NaCl 2 M, y finalmente se extrajo el exceso de NaCl a través de dos pasos de diálisis contra 200 volúmenes de Hepes 10 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M.

Cada pasos de diálisis tuvo una duración de al menos 6 horas y todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Todas las soluciones reguladoras utilizadas fueron tratadas con la resina Chelex 100 (Sigma) para extraer trazas de cationes divalentes.

2.11.6 Concentración de muestras de proteínas

Para concentrar las soluciones de proteína, se utilizaron dispositivos de concentración Amicon Ultra con un valor de corte de 10 kDa, en su versión de 15 ml. La solución de proteína se colocó en el compartimiento superior del dispositivo, se concentró mediante centrifugación a 5500 rpm y a 4°C en una centrífuga refrigerada y se descartó la solución filtrada del compartimiento inferior. Este protocolo se repitió las veces necesarias para alcanzar la concentración deseada.

2.12 Técnicas para la caracterización bioquímica de las enzimas

2.12.1 Determinación del contenido de Zn(II) utilizando el quelante colorimétrico PAR

El compuesto 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR) es un quelante colorimétrico que tiene la capacidad de quelar Zn(II) cambiando sus propiedades espectrales: en la forma libre presenta un

máximo de absorción a 414 nm mientras que unido a Zn(II) lo hace a 500 nm [80]. El método de determinación de Zn(II) en la muestra de proteína se basa en la desnaturalización de la misma para que libere el metal y el agregado de PAR a una concentración en exceso para capture todo el metal disponible.

Se construyó una curva de calibración en un rango de concentraciones de Zn(II) de 0 a 8 μM con una solución de estándar espectroscópico de ZnCl_2 de concentración conocida (Sigma). Las soluciones para dicha curva se prepararon en un medio conteniendo: cloruro de guanidinio 4 M, PAR 100 μM y Hepes 50 mM a pH 7,5 (previamente tratado con Chelex 100). De cada muestra se registró el espectro correspondiente entre 320 y 600 nm (en un espectrofotómetro Jasco V-550 o Jasco V-670). Se graficó la $\text{Abs}_{500\text{nm}}$ (corregida por la línea de base, restando el valor de $\text{Abs}_{600\text{nm}}$) vs la concentración de Zn(II) en el medio y se ajustó a una línea recta .

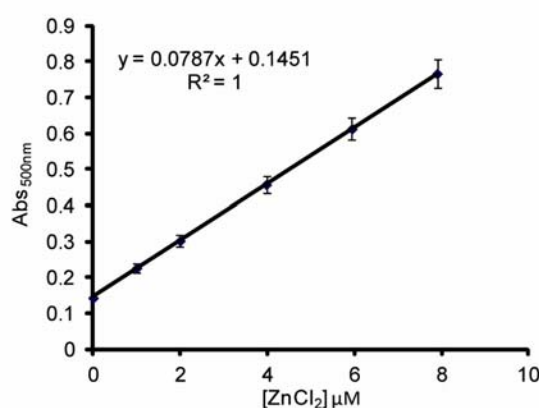


Figura 7: Curva de calibración PAR-Zn.

La absorbancia a 500 nm, que corresponde al máximo de absorbancia del complejo $\text{PAR}(\text{Zn})_2$ se graficó en función de la concentración de ZnCl_2 . Los datos se ajustaron a una línea recta y los parámetros obtenidos fueron empleados para la determinación de Zn(II) en muestras de proteína desnaturalizadas. Las condiciones del medio fueron: cloruro de guanidinio 4 M, PAR 100 μM y Hepes 50 mM a pH 7,5.

Para la muestra de enzima, se preparó un solución en dicho medio de una concentración de 3 μM . Luego de 10 min de incubación se registró el espectro de absorción de cada muestra entre 300 y 600 nm. Se interpoló el valor de absorbancia a 500 nm de la muestra incógnita para obtener la concentración de Zn(II) en la muestra. Como blanco se utilizó la solución amortiguadora empleada en el último cambio de diálisis. La concentración de equivalentes de Zn/molécula de proteína se obtuvo como la diferencia entre la concentración de Zn(II) obtenida en la muestra y la concentración de Zn(II) medida para el blanco.

2.12.2 Espectroscopía de Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular medidos en la región del UV lejano (200-250 nm) y cercano (250-320 nm) se realizaron en un espectrofotómetro J 810 (Jasco) a 25°C, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm y de 0,1 cm de paso óptico respectivamente. Se realizaron diez acumulaciones por espectro, evitando que el valor de HT (medida de saturación del fotomultiplicador) supere el valor de 500 voltios. Los espectros se registraron bajo las siguientes condiciones:

- Toma de datos cada 0,2 nm
- Ancho de banda: 1 nm
- Respuesta: 4 s
- Sensibilidad: alta para los espectros de UV lejanos y estándar para los de UV cercano.
- Velocidad de barrido: 50 nm / min

Se utilizó una concentración de enzima de aproximadamente 20-30 μM para las medidas en la región del UV lejano y entre 5-10 μM para el UV cercano.

2.12.3 Medidas de actividad β -lactamasa

La caracterización del perfil hidrolítico de la enzimas BclI y sus variantes se llevó a cabo a 30 °C, en medio Hepes 10 mM pH 7,5; NaCl 0,2 M; BSA 50 $\mu\text{g/ml}$, sin el agregado de Zn(II) y suplementado con Zn(II) a una concentración de 20 μM .

La actividad β -lactamasa fue determinada en base a la diferencia entre los espectros de absorción de la forma hidrolizada y no hidrolizada de cada compuesto β -lactámico, utilizando los valores publicados de longitud de onda a las cuáles se produce la diferencia máxima y el cambio del coeficiente de absortividad molar ($\Delta\epsilon$) correspondiente (Tabla 1)[70].

Tabla 1: Longitud de onda y coeficientes de absortividad molar utilizados para seguir las reacciones de hidrólisis espectrofotométricamente.

Sustrato	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\Delta\epsilon_{\lambda_{\text{máx}}} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
Cefalexina	266	-7800
Cefotaxima	260	-7500
Ceftazidime	350	-9000
Imipenem	300	-9000
Penicilina G	235	-775

Los cursos de reacción fueron seguidos utilizando espectrofotómetros Jasco V-550 o Jasco V-670, con cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. En primer lugar se determinaron las

velocidades iniciales de reacción a distintas concentraciones de sustrato, midiendo el cambio de absorbancia asociado a la hidrólisis del compuesto β -lactámico en función del tiempo. Los puntos de la zona lineal inicial fueron ajustados a una recta cuya pendiente corresponde al valor de velocidad inicial, en unidades de min^{-1} . Este valor dividido por el $\Delta\epsilon$ correspondiente y por el paso óptico de la cubeta utilizada es la velocidad de reacción en M/min.

Para cada antibiótico se realizó un seguimiento de su hidrólisis espontánea en el medio de reacción. Entre los sustratos empleados, Penicilina G e Imipenem sufren hidrólisis espontánea bajo las condiciones de ensayo a una velocidad no despreciable, por lo tanto para estos casos se determinó además la tasa de hidrólisis espontánea a cada concentración de sustrato usada, que luego se restó de los valores correspondientes en presencia de la enzima.

Se realizaron ajustes no lineales de los datos de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato a la ecuación de Michaelis-Menten, a partir de los cuales se obtuvieron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_M de la enzima frente a cada antibiótico. Para el cálculo de k_{cat} se tuvo en cuenta la concentración de la enzima activa, la cual se obtuvo corrigiendo la concentración de enzima según los equivalentes de Zn(II) /molécula determinados, como se describió previamente [81].

2.13 Determinaciones de estabilidad

2.13.1 Ensayos de termoestabilidad empleando extractos periplasmáticos

Se obtuvieron extractos periplasmáticos mediante el método de choque osmótico modificado, como se describió en la sección 2.7, para las variantes BcII-wt, G, GN, GV, GL, GVN, GLN, GLV y GLVN. Se tomaron alícuotas de estos extractos (conteniendo en general una concentración de la enzima MBL en el rango 0,01-0,05 μM) y se incubaron durante cinco minutos a una temperatura fija en el intervalo de 30 °C a 80 °C. Luego de la incubación a cada temperatura, estas alícuotas se diluyeron 1/20 en el medio de reacción en la cubeta para realizar medidas de velocidades iniciales como se describió en la sección 2.8. El medio de reacción empleado fue: Hepes 10 mM; NaCl 0,2 mM; pH 7,5; a 30° C. Cada valor de velocidad inicial se dividió por el valor correspondiente al extracto incubado en hielo previo a la reacción. De esta manera, cada punto en la curva representa la actividad remanente relativa luego de la incubación a temperaturas crecientes.

Las medidas de velocidades iniciales se realizaron con cefalexina en todos los casos excepto para BcII-wt, para la cual se utilizó cefotaxima. Además, para algunas variantes se repitieron las curvas utilizando cefotaxima y se confirmó que estas fuesen superponibles a las realizadas con cefalexina, permitiendo descartar que este efecto fuera dependiente del sustrato.

Los puntos se ajustaron a curvas sigmoideas de 4 parámetros y se obtuvo la temperatura de transición aparente (T_{Ma}). Las curvas se repitieron con al menos 3 preparaciones independientes de extractos periplasmáticos.

2.13.2 Medidas de estabilidad empleando enzimas purificadas

2.13.2.1 Termoestabilidad monitoreada mediante medidas de actividad

Se tomaron alícuotas de las preparaciones de las enzimas purificadas BcII-wt, G, GV, GLV y GLVN, y se procedió a realizar las medidas de termoestabilidad como se describió en la sección 2.13.1 para extractos periplasmáticos. Sin embargo, en un rango de concentraciones entre 0,02 μ M-0,3 μ M para la incubación, no pudieron obtenerse curvas sigmoideas dado que las enzimas presentaban una inactivación de más del 60 % al incubar a 30 °C. Se trabajó entonces a concentraciones mayores, entre 5-10 μ M para las incubaciones, se realizó un paso intermedio de dilución a 0,3 μ M en medio de reacción a 4 °C y luego se diluyó en el medio de reacción en la cubeta a 30 °C para realizar las medidas de velocidades iniciales. De esta manera pudieron obtenerse curvas sigmoideas. El medio de reacción empleado fue Hepes 10 mM; NaCl 0,2 mM; ZnSO₄ 20 μ M; BSA 50 μ g/ml; pH 7,5.

Las medidas de velocidades iniciales se realizaron con cefalexina en todos los casos excepto para BcII-wt, para la cual se utilizó cefotaxima. Además, para algunas variantes se repitieron las curvas utilizando cefotaxima y se confirmó que estas fuesen superponibles a las realizadas con cefalexina, descartando un efecto dependiente del sustrato.

Los puntos se ajustaron a curvas sigmoideas de 4 parámetros y se obtuvo la temperatura de transición aparente (T_{Ma}). Las curvas se repitieron al menos 2 veces con preparaciones de enzima purificada independientes.

2.13.2.2 Termoestabilidad monitoreada mediante medidas de dicroísmo circular

Se tomaron alícuotas de las preparaciones de las enzimas purificadas G, GV, GLV y GLVN a una concentración de 10 μ M y se incubaron durante cinco minutos a una temperatura fija entre 30 °C y 80 °C. Las muestras se centrifugaron 30 s a 13000 rpm a 4 °C para eliminar restos de

proteína precipitada y se realizaron luego espectros de dicroísmo circular en la región UV-lejano (200-250 nm) como se describió en la sección 2.12.2.

Se graficó la señal a 220 nm en función de la temperatura de incubación. Los puntos se ajustaron a curvas sigmoideas de 4 parámetros. Las curvas se repitieron al menos 2 veces con preparaciones independientes de enzima purificada.

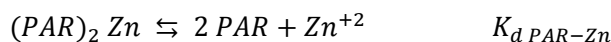
2.14 Determinación de constantes de disociación proteína-Zn(II) mediante ensayos de competición con PAR

2.14.1 Determinación de la constante de disociación del complejo (PAR)₂Zn

Como se describió en la sección 2.12.1, el compuesto PAR es un quelante colorimétrico cuyo espectro de absorción UV-Visible es alterado por la unión a Zn(II), desplazando el máximo de absorción desde 414 nm a 500 nm. Los datos de la bibliografía indican que este compuesto une un ión Zn(II) por cada dos moléculas de PAR, con una constante de formación del complejo (β_2) que varía entre 10^{12} - 10^{13} M⁻² en un rango de pH entre 5,5 y 7,3 [82–84]. La constante de disociación (K_d) y los coeficientes de absortividad molar del complejo (PAR)₂Zn son altamente dependientes del pH y la concentración de sales. Por lo tanto, los coeficientes de absortividad molar de PAR libre y del complejo (PAR)₂Zn a ambas longitudes de onda y la K_d correspondiente se determinaron en las condiciones elegidas para el ensayo: MOPS 50 mM; NaCl 0,1 M; pH 7,3; previamente tratado con Chelex 100 (Sigma) para eliminar trazas de cationes divalentes, a 25 °C. Los $\epsilon_{\text{PAR414nm}}$ y $\epsilon_{\text{PAR500nm}}$ se estimaron en forma directa mediante la medición de los valores de Abs a concentraciones crecientes de PAR, obteniendo los siguientes valores: $\epsilon_{\text{PAR414nm}} = 37000 \pm 1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{PAR500nm}} = 1300 \pm 65 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El $\epsilon_{\text{PAR2Zn500nm}}$ se estimó utilizando un exceso de Zn(II) respecto a las concentraciones de PAR, obteniendo un valor de $\epsilon_{\text{PAR2Zn500nm}} = 80000 \pm 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El $\epsilon_{\text{PAR2Zn414nm}}$ es el más complejo de determinar, debido a la contribución de la absorción del PAR libre, por ello este parámetro se dejó variar en el ajuste.

Se realizó una curva de unión de Zn(II) a PAR, empleando una concentración de PAR de 12,5 μM y concentraciones de Zn(II) variables entre 0,5 y 20 μM , para lo cual se empleó una solución de ZnCl₂ estándar espectroscópico (Sigma) de concentración conocida. Se obtuvieron los espectros de cada muestra entre 320 y 600 nm en cubetas de paso óptico 1 cm (en un espectrofotómetro Jasco V-670). De estos espectros se tomaron los valores correspondientes a

414 y 500 nm (corregidas por la línea de base, restando el valor de Abs_{600nm}) en función de la concentración de Zn(II) y se ajustó al siguiente modelo:



Los valores de $\epsilon_{PAR414nm}$, $\epsilon_{PAR500nm}$ y $\epsilon_{PAR2Zn500nm}$ se dejaron fijos en el ajuste en los valores determinados previamente, mientras que se dejó variar el $\epsilon_{PAR2Zn414nm}$ y la $K_{d PAR-Zn}$. En la Figura 8 se muestran los puntos experimentales junto con el ajuste realizado con el programa Dynafit [85]. Los valores hallados para los parámetros descriptos fueron: $\epsilon_{PAR2Zn414nm} = 13000 \pm 580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y la $K_{d PAR-Zn} = (2,6 \pm 0,2) \times 10^{-12} \text{ M}^2$.

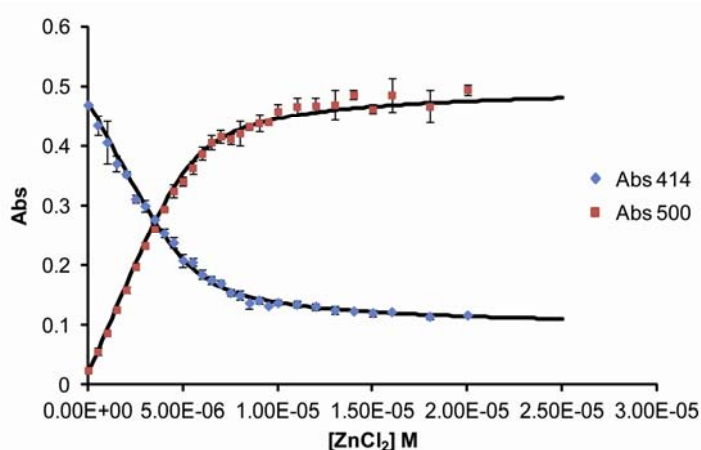


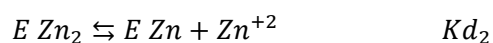
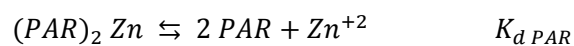
Figura 8: Determinación de la constante de disociación del complejo $(PAR)_2Zn$.

Se realizaron curvas de titulación de PAR (12,5 μM) con $ZnCl_2$ (entre 0,5 y 20 μM) y se graficaron los puntos correspondientes a la absorbancia a 414 nm y 500 nm. Los ajustes se realizaron con el programa Dynafit al modelo descrito en el texto. Los puntos se realizaron por triplicado.

2.14.2 Determinación de las constantes de disociación para la enzima BcII o sus variantes mediante competición con PAR

Para la determinación de las constantes de disociación correspondientes al primer y segundo evento de unión de Zn(II) para BcII o sus variantes, se realizaron curvas de titulación de soluciones de Zn(II) 1,5 μM y PAR 3 μM ó 6 μM con cantidades crecientes de la apoenzima, hasta alcanzar una concentración 3 μM de la misma. Cada punto de la curva de titulación se construyó por separado y por duplicado, llevándose a un mismo volumen final de 500 μL . Se registraron los espectros de absorción entre 320 y 600 nm de cada punto de la titulación en cubetas de paso óptico de 1 cm. Los datos de absorbancia a 414 y 500 nm para cada concentración de apoenzima se corrigieron restando el valor de la absorbancia a 600 nm, tomado como línea de base. Los datos

provenientes de las titulaciones se ajustaron con el programa Dynafit al siguiente modelo de los equilibrios que tienen lugar en la solución:



K_{d1} y K_{d2} son las constantes de disociación de los complejos de la enzima (E) con Zn(II) correspondientes al primer y segundo evento de unión. Para los ajustes se emplearon los valores de $K_{d(PAR)2Zn}$ y ε para cada complejo y longitud de onda determinados previamente.

Capítulo 3. Análisis de la selección de residuos ligandos de Zn(II) inusuales en la evolución de las MBLs. Estudio de la mutante C221D de la enzima BcII de *Bacillus cereus*

3.1 Introducción

Las MBLs de mayor relevancia clínica pertenecen a la subclase B1. Estas enzimas presentan dos sitios de unión a Zn(II) en su sitio activo. La enzima BcII de *B. cereus*, si bien no proviene de una cepa con impacto clínico, ha sido empleada como modelo de estudio de las MBLs de subclase B1 debido a que es una proteína muy estable y, por lo tanto, resulta sencillo obtener preparaciones de forma recombinante con buenos rendimientos y emplearla para diversos estudios espectroscópicos [53,86,87]. La primera estructura cristalográfica de BcII mostró un solo ión Zn(II) coordinado en forma tetraédrica a tres residuos de His (His116, His118 e His196) y a una molécula de H₂O/OH⁻, en el llamado sitio Zn1 [88]. Estructuras cristalográficas posteriores de BcII (Figura 9) y de otras MBLs de subclase B1, demostraron la presencia de un segundo sitio de unión a Zn(II), denominado Zn2, que presenta una geometría trigonal bipiramidal y como ligandos los residuos Asp120, Cys221 e His263, una molécula de H₂O/OH⁻ a puente con los dos iones Zn(II) y una molécula de agua adicional (Figura 9) [51,54,55,89].

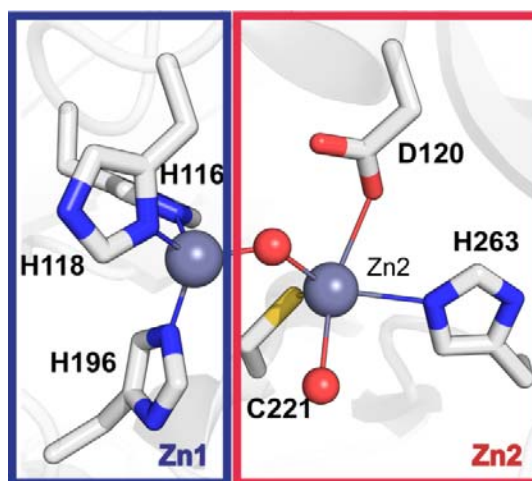


Figura 9: Sitio activo de la MBL BcII de *B. cereus*.

Las esferas grises corresponden a los iones Zn(II) y las esferas rojas a moléculas de agua. Los residuos ligando de los iones Zn(II) se muestran como bastones. Se marcan los denominados sitios Zn1 y Zn2. La imagen se construyó en base a la estructura cristalográfica PDB 1BC2 [51].

Una de las mayores controversias en cuanto al estudio mecanístico de las MBLs de subclase B1 ha sido la identidad de la especie activa [53,79,87,81,90,91]. Es decir, si basta con un solo ión Zn(II) para la actividad β -lactamasa (y si así fuese, cuál de los dos) o si se requieren los iones Zn(II) unidos a ambos sitios.

La hidrólisis de los compuestos β -lactámicos requiere de un ataque nucleofílico en el grupo carbonílico, la ruptura del enlace C-N y la protonación del átomo de nitrógeno. El sitio Zn1, por su coordinación a 3 residuos de His y una molécula de H₂O es similar al encontrado en otras hidrolasas de Zn(II), como la anhidrasa carbónica, donde el Zn(II) actúa en la deprotonación y activación de una molécula de H₂O para que realice el ataque nucleofílico. Por ello, en un principio, se pensó que el sitio Zn1 podría ser el único esencial para la catálisis, mediante la generación de la especie nucleofílica. Este razonamiento, junto con algunas evidencias experimentales [92–94], así como la primera estructura cristalográfica de BcII [88], sugerían que la especie activa relevante es aquella con el ión Zn(II) coordinado al sitio Zn1. El sitio Zn2 se consideraba un sitio co-catalítico, que permitiría aumentar la actividad de la enzima, pero que no sería indispensable para la actividad [79,95–97]. Sin embargo, la existencia de las MBLs de subclase B2, las cuales son activas con un solo ión Zn(II) coordinado al sitio Zn2, contradice dicha hipótesis [98].

Estudios espectroscópicos realizados mediante sustitución del Zn(II) por Co(II) en BcII, mostraron que las dos posibles especies monometálicas (con el metal en uno u otro sitio) y la especie dimetálica pueden coexistir en equilibrio en relaciones de Co(II)/proteína subestequiométricas [81]. La dificultad para definir la identidad de la o las especies activas radica en que experimentalmente ha resultado imposible aislar las especies mono-Zn(II) en solución para realizar medidas de actividad. Esto podría deberse a que las afinidades por Zn(II) de ambos sitios sean muy similares o a que exista incluso una unión cooperativa de los dos equivalentes de Zn(II), según han sugerido estudios de espectrometría de masas y de RMN [91]. Sin embargo, las medidas de afinidad por Zn(II) obtenidas por distintos grupos y usando distintos métodos han brindado datos contradictorios, un factor que complica más aun el análisis [53,97,99].

Como se mencionó en la Sección 1.5.1, la presencia de un residuo de Cys en la posición 221 es una característica distintiva de las MBLs de subclase B1 y B2 respecto a las demás enzimas de la superfamilia. La función de este ligando ha sido estudiada en distintas MBLs, habiéndose realizado sustituciones por Ser y Ala, residuos que no son buenos ligandos metálicos. El patrón

observado en general es que las enzimas mutantes son prácticamente inactivas por su incapacidad de unir Zn(II) en el sitio Zn2 y en algunos casos recuperan parcialmente la actividad ante el agregado de Zn(II) en exceso [53,79,100].

Para la enzima IMP-1 se construyó la mutante C221D [101]. Esta sustitución es más informativa, dado que el Asp es un buen ligando de Zn(II) y, de hecho, es el ligando conservado en esta posición en la superfamilia de MBLs. Se observó que en exceso de Zn(II), esta mutante es capaz de unir 2 equivalentes de dicho metal y de equiparar la actividad de la enzima silvestre. Durante la Tesis del Dr. Javier M. González se estudió la mutante C221D de BclI [61]. Se observó que dicha mutante presenta una eficiencia catalítica comparable a la enzima silvestre contra distintos β -lactámicos en medio de reacción con exceso de Zn(II). En cambio, la misma presenta una actividad casi indetectable en un medio de reacción sin agregado de Zn(II). En base a estudios mecanísticos y a las estructuras cristalográficas obtenidas a partir de cristales crecidos en exceso de Zn(II) y sin Zn(II) agregado, se observó que a bajas concentraciones de Zn(II) se forma la especie mono-Zn1 (Figura 10). De esta manera, se obtuvo por primera vez una variante de una enzima B1 activa con un tipo de unión secuencial de los dos iones Zn(II). Esto permitió medir la actividad de la especie mono-Zn1 en forma aislada, la cual resultó ser inactiva [102].

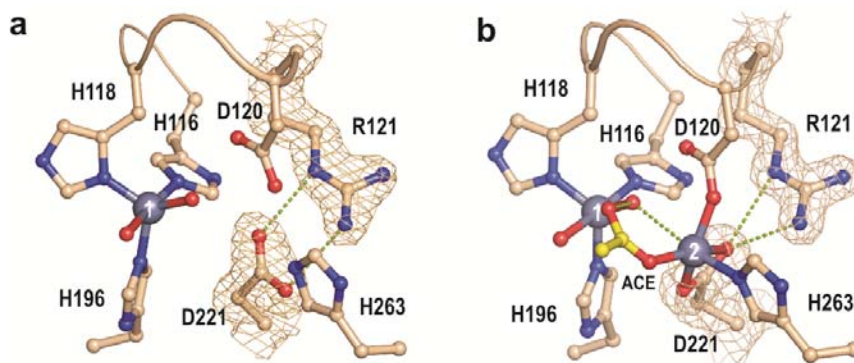


Figura 10: Estructura de los sitios activos de BclI-C221D en sus formas mono- y di-Zn(II).

Las esferas grises representan los iones Zn(II), en la línea punteada se muestran las interacciones electrostáticas relevantes. A) Estructura del sitio activo correspondiente a la enzima BclI-C221D mono-Zn(II) (PDB 3KNS), con el ión Zn(II) coordinado al sitio Zn1, obtenida a partir de cristales crecidos a una concentración de Zn(II) 1 mM y 80 μ M de proteína. El residuo Asp221 forma un puente salino con la cadena lateral del residuo Arg121 de manera que se ve dificultada la coordinación de un ión Zn(II) en el sitio Zn2. B) Estructura del sitio activo correspondiente a la enzima BclI-C221D di-Zn(II) (PDB 3KNR), obtenida a partir de cristales crecidos a una concentración de Zn(II) de 20 mM y 80 μ M de proteína. El residuo Asp221 experimenta una rotación de manera tal que forma un puente entre el ión Zn(II) del sitio Zn2 y el residuo Arg121. Figura adaptada de [102].

Por otro lado, se examinó la capacidad de conferir resistencia de BcII-wt y BcII-C221D a células de *E. coli*. Se empleó un sistema de expresión inducible en el cual el gen de la MBL se encuentra fusionado al péptido líder *pelb* para dirigir el exporte al periplasma (ver sección 2.1.1). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para distintos β -lactámicos en medio rico (Luria-Bertani) resultaron sustancialmente menores para la enzima mutante. Mediante suplementación con Zn(II) en el medio de cultivo, en cambio, se logró revertir dicho fenotipo [102].

Dado que la mutante C221D *in vitro* presenta una actividad enzimática comparable a la de la enzima silvestre, la gran diferencia en el perfil de resistencia resultaba difícil de explicar. Ante la falta de correlación entre los parámetros cinéticos y el fenotipo de resistencia nos propusimos explorar qué otros factores inciden en la funcionalidad de la enzima *in vivo*. Para ello, se decidió estudiar:

- La dependencia de la actividad con la concentración de Zn(II).
- El comportamiento *in vivo* de las enzimas mediante seguimiento de los niveles de expresión en periplasma y actividad de extractos periplasmáticos frente a distintas concentraciones de Zn(II).
- Afinidad de las enzimas por el ión Zn(II). Las medidas de afinidad por el ión Zn(II) para la enzima BcII han resultado contradictorias entre distintos grupos, por ello, decidimos poner a punto un método para realizar medidas de constantes de disociación de dicho ión.

3.2 Resultados

3.2.1 Dependencia de la actividad *in vitro* de BcII-C221D respecto a la cantidad de Zn(II) en el medio de reacción.

Resultados previos en el grupo revelaron que la eficiencia hidrolítica de la mutante C221D en un medio con exceso de Zn(II) es equiparable a la de la enzima silvestre, mientras que sin agregado de Zn(II), la actividad es indetectable. Para ampliar la caracterización de este aspecto, se decidió comparar el comportamiento de la enzima silvestre y de la mutante C221D en un amplio rango de concentraciones de Zn(II). En el caso de BcII-C221D, resulta llamativo que esta enzima puede obtenerse en el paso final de la purificación con valores cercanos a 2 equivalentes de Zn(II)/molécula de proteína y sin embargo requiera un exceso de Zn(II) en el medio de reacción para activarse. Por esta razón, para evaluar si el contenido metálico inicial de esta enzima influye

en su activación, el experimento se realizó tanto con muestras de holo-enzima como de apo-enzima.

Se obtuvieron preparaciones de las enzimas silvestre y mutante en forma recombinante mediante el protocolo puesto a punto en el laboratorio para BcII [78], el cual se describe en la sección 2.11. Brevemente, la sobreexpresión se llevó a cabo en células de *E. coli* empleando el plásmido pET-TERM, que permite expresar la lactamasa fusionada en su extremo amino a la proteína GST. La inducción de la expresión se realizó mediante el agregado de IPTG, a 37 °C durante 4 hs. La proteína de fusión se purificó a partir del extracto crudo mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina GSH-agarosa. Luego de un corte con trombina para separar la fusión, la proteína de interés se aisló mediante una resina de intercambio iónico CM-Sefarosa. De esta manera, se obtuvieron preparaciones de BcII-wt y BcII-C221D con $1,7 \pm 0,1$ y $1,8 \pm 0,1$ equivalentes de Zn(III)/molécula de enzima respectivamente. A partir de estas muestras de holo-enzima se obtuvieron muestras de apo-enzima mediante pasos de diálisis con agregado de agentes quelantes (2.11.5).

Se prepararon medios de reacción con cantidades de Zn(II) conocidas mediante un tratamiento previo con Chelex-100 y agregados de ZnCl_2 a partir de una solución patrón (estándar espectroscópico de Sigma). A cada concentración de Zn(II) se midieron velocidades iniciales de hidrólisis para cefotaxima a concentración saturante de sustrato (200 μM) (Figura 11).

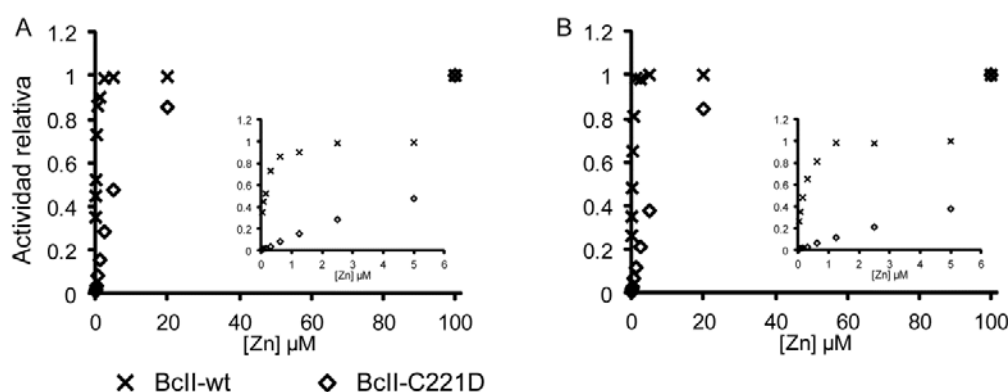


Figura 11: Dependencia de la actividad enzimática respecto a la concentración de Zn(II) en el medio para las enzimas BcII-wt y BcII-C221D.

Se midieron las velocidades iniciales de hidrólisis de cefotaxima (a concentración saturante, 200 μM) en concentraciones crecientes de ZnCl_2 para las muestras de BcII-wt y BcII-C221D en sus formas de A) holo-enzima y B) apo-enzima. Las velocidades de reacción se muestran relativas al valor a 100 μM Zn(II). Medio de reacción: Hepes 15mM pH 7.5, NaCl 200mM, previamente tratado con CHELEX-100, a 30°C.

Observamos que BcII-wt es capaz de activarse a muy baja concentración de Zn(II) en el medio, alcanzando el 50 % de la actividad máxima frente un agregado de 0,15 μM de Zn(II), y el 100 % alrededor de 1 μM . En cambio, C221D alcanza el 50 % de su actividad máxima alrededor de 5 μM y el 100 % a 100 μM de Zn(II).

Tanto para BcII-wt como para BcII-C221D, las curvas realizadas con la muestra de holo-enzima y de apo-enzima son superponibles. Esto nos indica que, independientemente del contenido de Zn(II) de la muestra, cuando se diluye la proteína en el medio de reacción se restablece el equilibrio entre las distintas especies de la proteína (apo, mono y di-Zn(II)) y el ión Zn(II) en solución. En el caso de C221D, se observa que aunque se tome como punto de partida la muestra de holo-enzima con casi 2 iones Zn(II)/molécula de proteína, se requieren altas concentraciones de Zn(II) en el medio de reacción para activar la enzima en comparación con la enzima silvestre. Esto sugiere que la mutante C221D presenta menor afinidad por dicho ion que la enzima silvestre.

3.2.2 Caracterización del comportamiento de la enzima BcII-C221D vs BcII-wt en extractos periplasmáticos de *E. coli*. Niveles de expresión y actividad.

Previamente se observó que la capacidad de conferir resistencia de la mutante C221D en medio de cultivo rico (LB) se ve reducida respecto a BcII-wt. Esto puede deberse a diversos factores: que la mutante presente defectos en sus niveles de expresión y/o exportación al periplasma, que no se pliegue correctamente en dicho compartimiento, que presenten interacciones diferenciales en el periplasma que activen o inactiven una u otra variante, o que la mutante no pueda captar el Zn(II) en forma adecuada.

Los niveles de expresión se evaluaron en extractos de células totales y en extractos periplasmáticos mediante SDS-PAGE y *Western Blots* (Figura 12). Se observó que la cantidad de enzima presente en ambos extractos es similar para la mutante C221D y BcII-wt, descartando este factor como contribuyente a la disminución en la resistencia.

Con los extractos periplasmáticos se realizaron medidas de velocidades iniciales contra cefalexina. Se observó que sin Zn(II) agregado al medio de reacción, la mutante no presenta actividad; mientras que con Zn(II) en exceso, la actividad es comparable a la de la enzima silvestre (Figura 13). Esto sugiere que la mutante C221D se pliega correctamente en el periplasma, dado

que es capaz de recuperar actividad en exceso de Zn(II), y que presenta un comportamiento dependiente de la cantidad de Zn(II) similar al observado con la proteína pura.

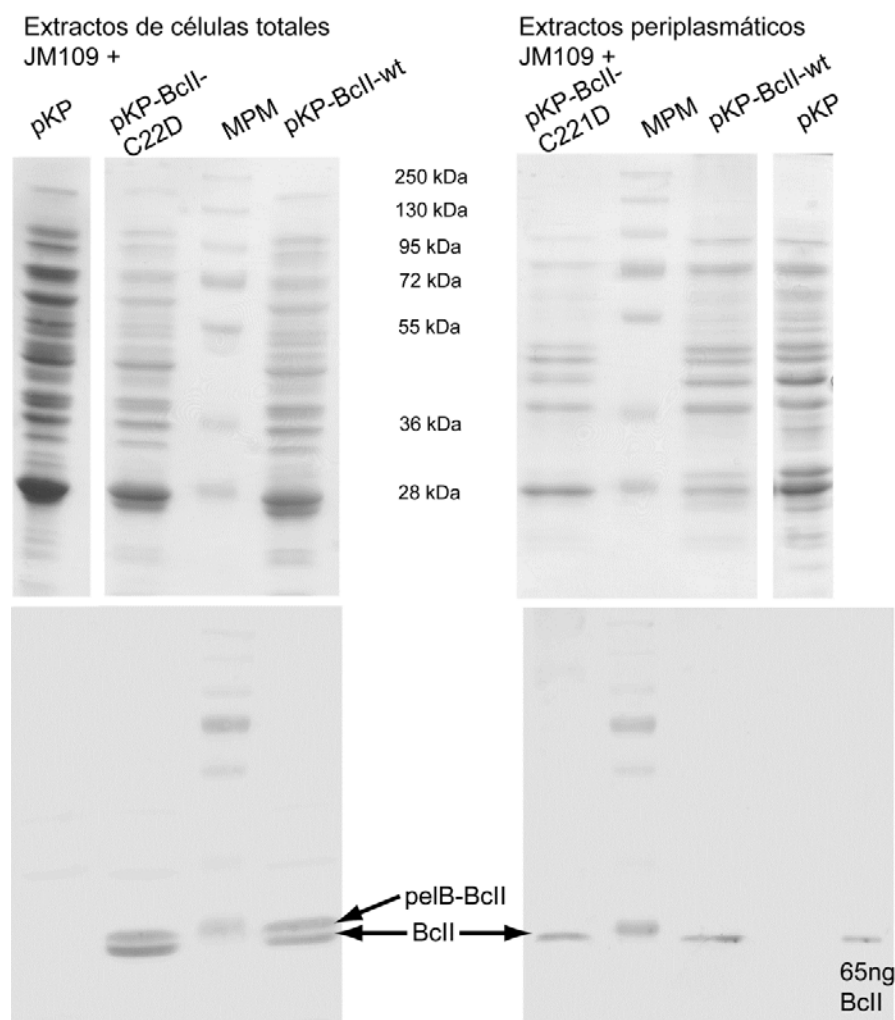


Figura 12: Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas BcII-wt y BcII-C221D en células de *E. coli*. A partir de células de *E. coli* transformadas con los plásmidos pKP, pKP-BcII-wt y pKPBcII-C221D e inducidas con IPTG 0,5 mM, se obtuvieron extractos de células totales y de la fracción periplasmática. Estos se sembraron en geles SDS-PAGE 12 % y se realizaron ensayos de *Western Blots*. En los extractos totales se observan la formas pelB-BcII (péptido líder + proteína, de 27kDa) y la forma madura (25 kDa). El revelado de los *Western Blots* se realizó mediante anticuerpos policlonales anti-BcII-wt de conejo y anticuerpos anti-IgG de conejo de cabra conjugados a fosfatasa alcalina (BIO-RAD). MPM: Marcador de Peso Molecular, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

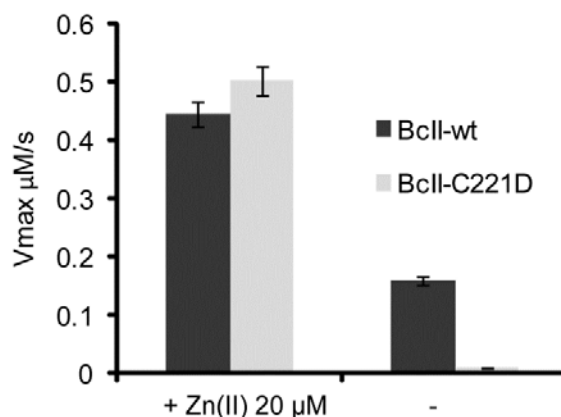


Figura 13: Actividad de las enzimas BclI-wt y BclI-C221D en extractos periplasmáticos con y sin exceso de Zn(II) en el medio de reacción.

Se realizaron medidas de velocidades iniciales de reacción con cefotaxima a concentración saturante (200 μM) utilizando extractos periplasmáticos de células de *E. coli* que hubiesen expresado las enzimas BclI-wt y BclI-C221D. Se utilizó el medio de reacción Hepes 15mM; NaCl 200 mM; pH 7,5 previamente tratado con Chelex-100 y el mismo suplementado con ZnCl₂ 20 μM.

3.2.3 Medidas de afinidad por Zn(II) de BclI wt y BclI C221D. Determinación de las constantes de disociación por competición con el quelante PAR.

Desde sus primeras caracterizaciones bioquímicas y estructurales se han realizado distintos estudios del modo de unión de Zn(II) para BclI y la cuantificación de sus afinidades relativas, con resultados dispares. Métodos como espectroscopía de masas utilizando ionización por electrospray (ESI-MS) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) sugirieron la presencia de cooperatividad positiva en esta unión [91]. Si bien por ESI-MS pueden observarse las señales de las distintas especies en equilibrio (apo, mono-Zn(II) y di-Zn(II)), este método no se puede emplear en forma cuantitativa, dado que deberían conocerse los coeficientes de ionización de cada especie por separado. En las titulaciones seguidas mediante espectros de RMN, sólo han podido detectarse las especies apo y di-Zn(II), por lo que tampoco pueden estimarse las constantes de disociación para los dos eventos de unión. Aparentemente, la/s especie/s mono-Zn(II) podrían no detectarse por la baja sensibilidad del método. Ensayos de calorimetría de titulación isotérmica con BclI mostraron una sola transición con una pendiente muy pronunciada que tiene lugar en el punto de la titulación donde se agregan 2 equivalentes de Zn(II)/molécula de proteína [90]. Esto sugiere que en esa transición se engloban los 2 eventos de unión. Los autores informaron una constante de disociación (K_d) de 30 nM para el segundo evento de unión. Por otro lado, ensayos de competición con el reactivo metalocrómico Mag-Fura han sido exitosamente empleados para estimar las K_d s de BclI para el ión Co(II) (las cuales son $K_{d1}=(0,10 \pm 0,06) \mu\text{M}$ y $K_{d2}=(0,17 \pm 0,04) \mu\text{M}$

[81]. Sin embargo, para Zn(II) han dado lugar a resultados contradictorios incluso en trabajos de los mismos autores: $K_{d1}=0,62$ nM y $K_{d2}=1,5$ μ M [53]; $K_{d1}=0,12$ nM y $K_{d2}=0,99$ nM [99]. Según un trabajo posterior [91], las determinaciones con Mag-Fura no serían adecuadas dado que dicho compuesto presenta una $K_d=80$ nM mientras que las K_d para BclI serían menores a dicho valor.

Ante esta variedad de resultados nos propusimos poner a punto un método apropiado para estimar las afinidades por Zn(II) para las MBLs. Consideramos que, por lo antes descrito, un método de competición sería adecuado, pero debíamos emplear un reactivo distinto de Mag-Fura. Se decidió utilizar el quelante cromogénico 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR), que ha sido empleado exitosamente para medir afinidades por Zn(II) con otras proteínas [82,84,103]. Si bien la constante de formación del complejo $(\text{PAR})_2\text{Zn}$ es muy sensible a las condiciones del medio, se han reportado valores de entre 10^{12} - 10^{13} M^{-2} en un rango de pH entre 5,5 y 7,3 [82–84]; por lo que se esperaba que fuese un buen competidor por Zn(II) para BclI.

El compuesto PAR en su forma libre presenta un máximo de absorción a 414 nm, mientras que el máximo de absorción al formar el complejo $(\text{PAR})_2\text{Zn}$ se corre a 500 nm. Se determinaron los coeficientes de absortividad molar de las distintas especies y la constante de disociación del complejo $(\text{PAR})_2\text{Zn}$ en las condiciones a utilizar en el ensayo (MOPS 50 mM; NaCl 0,1 M; pH 7,3; a 25°C), como se describe en la sección 2.14.1. Los parámetros obtenidos fueron: $\epsilon_{\text{PAR}414\text{nm}}=37000 \pm 1800$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{PAR}500\text{nm}}=1300 \pm 65$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{PAR}2\text{Zn}414\text{nm}}=13000 \pm 580$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{PAR}2\text{Zn}500\text{nm}}=80000 \pm 4000$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la $K_d(\text{PAR})_2\text{Zn}=(2,6 \pm 0,2) \times 10^{-12}$ M^2 . Los ensayos de competición se realizaron a dos concentraciones fijas de PAR y Zn(II), variando la concentración de apo-proteína. En la Figura 14 se muestran los espectros obtenidos al agregar cantidades crecientes de apo-proteína a una mezcla de PAR (3 μ M) y Zn(II) (1,5 μ M). En la misma puede seguirse el orden de la titulación a través del gradiente de colores, desde el rojo (espectro inicial) al azul (espectro final). En la Figura 15 se muestran las curvas resultantes correspondientes a las medidas de Abs a 414 y 500 nm.

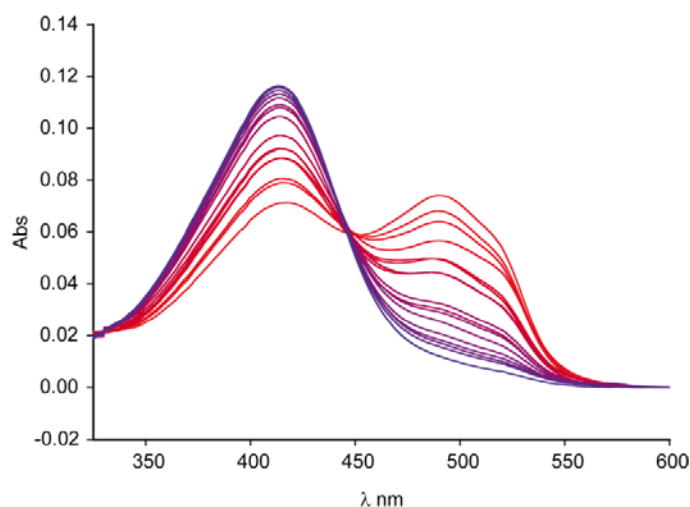


Figura 14: Espectros correspondientes a los experimentos de competencia por Zn(II) entre el quelante cromogénico PAR y la apo-proteína BcII-C221D.

El espectro inicial (rojo) corresponde a una mezcla de PAR (3 μ M) y Zn(II) (1,5 μ M), a medida que se agrega apo-proteína la absorbancia a 500 nm (máximo para el complejo (PAR)₂Zn) disminuye y la absorbancia a 414 nm (máximo para PAR libre) aumenta. El espectro final (azul) corresponde al agregado de 3 μ M de apo-proteína.

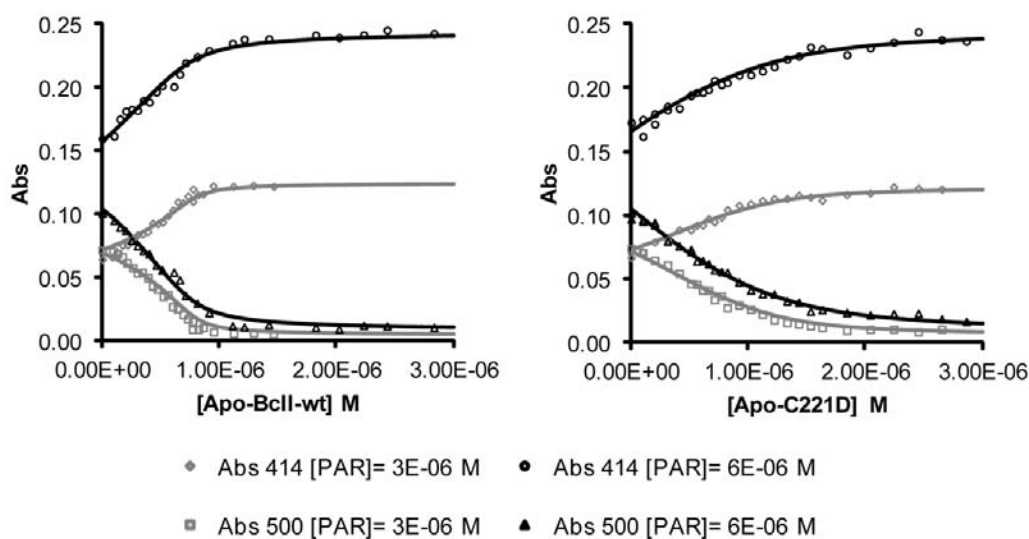
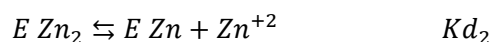
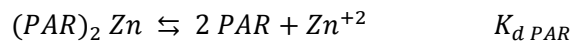


Figura 15: Ensayos de competición con PAR para la determinación de la afinidad por Zn(II) de las enzimas BcII-wt y BcII-C221D.

Se agregaron concentraciones crecientes de apo-proteína a una solución de [Zn(II)] = 1,5 μ M y [PAR] = 6 μ M o [PAR] = 3 μ M. El incremento en absorbancia a 414 nm refleja la liberación del PAR y la disminución en absorbancia a 500 nm refleja la desaparición del complejo (PAR)₂Zn. Las medidas se realizaron en solución amortiguadora MOPS 40 mM, NaCl 100 mM, pH 7.3, previamente tratada con CHELEX-100, a 25°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas. Los ajustes se realizaron con el programa Dynafit [85] según el modelo descrito en el texto.

Los datos se ajustaron en base al siguiente modelo, donde K_{d1} y K_{d2} son las constantes de disociación macroscópicas del primer y segundo evento de unión respectivamente:



Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 2. Para BcII-wt observamos que la K_{d1} no puede definirse con precisión, aunque estaría en el rango nanomolar, cercano al valor de K_{d2} . Puede interpretarse que para valores de K_{d1} dentro del rango de error obtenido, las curvas de competición serían muy similares entre sí dentro del error experimental. Esto sugiere que estamos trabajando cerca del límite de la sensibilidad del método. Es evidente que la formación de la especie di-Zn(II) está facilitada en la enzima BcII-wt a bajas concentraciones de Zn(II) gracias a que ambas constantes de disociación son similares y están en el rango bajo nanomolar.

Tabla 2: Constantes de disociación para el primer y segundo evento de unión de Zn(II) para BcII-wt y BcII-C221D estimadas mediante ensayos de competición con el compuesto PAR .

	K_{d1} (nM)	K_{d2} (nM)
BcII-wt	$1,9 \pm 3,3^{\#}$	$8,6 \pm 3,9$
BcII-C221D	$9,2 \pm 1,7$	267 ± 71

Los datos mostrados corresponden a los valores de mejor ajuste para cada parámetro \pm el error estándar según se estimó con el programa Dynafit [85].

[#]En este caso K_{d1} no se pudo estimar con precisión.

En el caso de la mutante BcII-C221D se obtuvieron dos constantes de disociación diferentes entre sí. La afinidad de la unión por el primer equivalente de Zn(II) está en el rango bajo nanomolar. Como se describió en la sección 3.1, los datos estructurales y espectroscópicos indican que este evento de unión tiene lugar en el sitio Zn1, y que la especie mono-Zn(II) que se forma es inactiva. La diferencia de afinidad entre BcII-wt y C221D se refleja en la K_{d2} , que aumenta de $(8,6 \pm 3,9)$ nM a (267 ± 71) nM. En conjunto con los resultados previos, descritos en la sección 3.1, puede interpretarse que la mutación C221D disminuye notoriamente la afinidad del sitio Zn2. Esto explica la dificultad de la enzima mutante de ensamblar la especie activa di-Zn(II) a bajas concentraciones de Zn(II). Por otro lado, el hecho de que la mutante BcII-C221D sea incapaz de

conferir los niveles de resistencia de la enzima silvestre, incluso en un medio rico, y que recupere dicha capacidad en exceso de Zn(II), también nos indica que la disponibilidad de Zn(II) en el periplasma es limitada.

3.3 Discusión

Los residuos de Cys se encuentran comúnmente como ligandos de Zn(II) en sitios estructurales, tales como los motivos denominados dedos de zinc. Dichos sitios presentan en general cuatro ligandos, de los cuales los residuos de Cys representan un 80%, los residuos de His un 19% y excepcionalmente se presentan residuos de Asp/Glu o Ser. Los residuos de Cys son de alta ocurrencia en estos sitios debido a su capacidad de transferir carga negativa al Zn(II) formando enlaces de carácter fuertemente covalentes [60]. En estos casos los residuos de Cys se encuentran ocluidos en el interior de la estructura de la proteína. En cambio, los sitios catalíticos presentan una mayor variabilidad en el número de coordinación y suelen contener algún ligando exógeno. Los ligandos más comunes son His (47%) y Asp/Glu (36%), mientras que el residuo de Cys es poco común (13%)[60]. Los residuos de Cys en sitios catalíticos quedan más expuestos a la oxidación respecto a los estructurales, lo cual explicaría que sean poco comunes. En varios ejemplos de enzimas que presentan un residuo de Cys como ligando de Zn(II) el mecanismo de reacción cursa a través de la alquilación del grupo tiolato: metionina sintasa, metanol coenzima M metiltransferasa, farnesil transferasa, geranil-geranil transferasa y la proteína de reparación de ADN Ada [104].

En los casos de enzimas con dos iones metálicos en el sitio activo, de los cuales uno o los dos son iones Zn(II), una característica particular es la existencia de un ligando a puente entre ambos metales. Este ligando es en general un residuo de Asp/Glu y, en algunos casos, una molécula de agua. En estos sitios predominan los residuos de Asp e His, y en menor medida Glu. También se han encontrado residuos inusuales, como carbonilos amida de Asn, Gln y el esqueleto peptídico, grupos hidroxilos de Ser, Thr y Tyr y grupos amida de Lys y del aminoácido N-terminal de la proteína. El residuo de Cys como ligando aparece excepcionalmente en las MBLs B1 y B2 [105].

La presencia del residuo de Cys221 como ligando en el sitio activo de las enzimas MBLs B1 y B2, más precisamente en el denominado sitio Zn2, resulta entonces llamativa. Más aún, siendo que en la superfamilia de MBLs en dicha posición se encuentra conservado un residuo de Asp, que

actúa como ligando bidentado coordinado a ambos iones Zn(II). Esto sugiere que el residuo de Cys ha sido conservado en las MBLs B1 y B2 por motivos funcionales. Previamente en nuestro grupo se estudió la mutante BcII-C221D para comprender por qué el residuo de Cys en esa posición confiere una ventaja funcional a la enzima. Se observó que la misma es capaz de equiparar los valores de eficiencia hidrolítica de la enzima silvestre cuando se trabaja en un medio de reacción con exceso de Zn(II). Sin embargo, la enzima mutante BcII-C221D es incapaz de conferir resistencia a células de *E. coli* a niveles comparables a la enzima silvestre, incluso trabajando en medio rico. El fenotipo de resistencia se recupera sólo si dicho medio se suplementa con exceso de Zn(II). En el presente trabajo nos propusimos explorar las razones por las cuales esta mutante no resulta eficiente *in vivo*.

Se corroboró que la enzima BcII-C221D se expresa y se exporta al periplasma en cantidades similares a la proteína silvestre. También se comprobó que presenta actividad en los extractos periplasmáticos, siempre que se suplemente el medio de reacción con Zn(II). De esta manera, se descartó la existencia de defectos en la expresión, exporte o plegado en el periplasma como responsables de la disminución en la capacidad de conferir resistencia.

Observamos que la disponibilidad de Zn(II) tiene un fuerte impacto en la funcionalidad de la mutante C221D que se manifiesta en todos los niveles: actividad de la proteína pura, actividad en extractos de periplasma, y capacidad de conferir resistencia. Esto, junto con los datos previos estructurales y mecanísticos, sustenta la hipótesis de que la mutación C221D afecta la afinidad por el ión Zn(II). Cabe destacar que mediante estudios de mutagénesis sobre los otros dos residuos ligandos de Zn(II) en el sitios Zn2, His263 y Asp120, se observó que ambos son esenciales para la catálisis pero que no afectan la unión de Zn(II) [78,100]. En otras palabras, el fenómeno de actividad dependiente de Zn(II) es exclusivo de las mutantes en Cys221.

Para evaluar directamente el efecto de esta mutación en la afinidad se puso a punto un método para medir constantes de disociación (K_d s) por Zn(II) mediante ensayos de competición con el quelante colorimétrico denominado PAR. Para la enzima silvestre se evidenciaron dos eventos de unión con K_d s muy similares en el rango bajo nanomolar, mientras que BcII-C221D presenta dos constantes de disociación marcadamente diferentes. Los estudios estructurales y mecanísticos realizados en el grupo permiten deducir que el sitio cuya afinidad se encuentra

afectada en la mutante BclI-C221D es el sitio Zn₂, y que la variante que se forma a bajas concentraciones de Zn(II), con un solo ión Zn(II) unido en el sitio Zn₁, es inactiva.

Por otro lado, vemos que la pérdida de afinidad por Zn(II) afecta la funcionalidad de la enzima incluso en un medio rico, lo cual sugiere que las cantidades de Zn(II) disponible en el periplasma son limitadas. *E. coli* es capaz de secuestrar iones Zn(II) del medio hacia el citoplasma incluso en condiciones restrictivas [106]. En el espacio periplasmático, en cambio, existe una alta competencia por el Zn(II) entre las metaloproteínas que lo requieren y los sistemas de alta afinidad de importe hacia el citoplasma [107]. La cantidad de Zn(II) disponible en el periplasma aparentemente depende de la concentración de Zn(II) en el medio, aunque no existen en la bibliografía estudios detallados sobre este aspecto. Respecto a la concentración total de Zn(II) en el plasma sanguíneo en humanos, se han reportado valores de entre 12-17 μM , lo cual es comparable a la concentración de Zn(II) en el medio de cultivo empleado (alrededor de 5 μM). De esta concentración total en el plasma, casi el 98% del mismo está unido a proteínas, el resto se encuentra unido a compuestos orgánicos de bajo peso molecular (como aminoácidos o citrato), mientras que el *pool* de Zn(II) libre está entre 0.1-1 nM [108]. A esto se suma que en los sitios de infección los neutrófilos expresan una proteína denominada calprotectina en un mecanismo defensa denominado “inmunidad nutricional” [109,110]. Esta proteína secuestra Zn(II) y Mn(II) dificultando la adquisición de estos nutrientes esenciales para el patógeno. La afinidad por Zn(II) de la proteína calprotectina varía según la concentración de Ca(II) en el rango nanomolar a sub-nanomolar [111]. Queda claro que en el ambiente donde debe expresarse la MBL para conferir resistencia existe una alta competencia por Zn(II).

El comportamiento de la mutante BclI-C221D demuestra que el residuo de Cys en la posición 221 es esencial para asegurar la unión al sitio Zn₂ en condiciones de concentración de Zn(II) limitantes, lo cual explica su selección para la actividad β -lactamasa. Los resultados obtenidos con la enzima BclI sugieren que las MBLs de subclase B1 presentan un modo de unión de Zn(II) de alta afinidad por ambos sitios. Esto nos indica que no hay preferencia en la unión del metal por un sitio metálico, sino que ambos pueden llenarse *in vivo*. Es decir, que la especie relevante *in vivo* es la di-Zn(II).

Capítulo 4. Descripción del “paisaje de aptitud” en metalo-β-lactamasas utilizando como modelo de estudio BcII y variantes obtenidas mediante Evolución Molecular Dirigida

4.1 Introducción

4.1.1 Marco teórico en evolución de proteínas: “paisaje de aptitud”

En 1970, John Maynard Smith introdujo una descripción de la evolución de proteínas como un recorrido a través de un espacio de secuencias [112]. Una de las críticas más fuertes en contra de la teoría de la selección natural se basa en que, al ser tan grande el número posible de secuencias polipeptídicas (para una proteína de 100 aminoácidos, existen 20^{100} secuencias posibles), es poco probable que las proteínas funcionales hayan surgido por mutaciones al azar. J. Maynard Smith argumentó que las mutaciones favorables se incorporan en forma secuencial, y no en forma simultánea, de manera que a cada paso en el recorrido la proteína no sufre alteraciones drásticas y el resultado es una proteína que funciona igual o mejor que la anterior [113].

En este modelo, a cada secuencia le corresponde un valor de “aptitud”, que en la evolución natural es una medida de la habilidad del organismo portador de reproducirse más rápidamente en un dado ambiente. La representación de la aptitud versus el espacio de secuencia se conoce como “paisaje de aptitud”. En este paisaje pueden aparecer uno o más picos que representan proteínas que confieren valores de aptitud altos. La rugosidad del paisaje depende de cada proteína y de las condiciones de selección ambientales [114].

Un factor que contribuye a moldear el paisaje es la interacción entre mutaciones, esto significa que el efecto en la aptitud de una mutación es diferente según esté o no presente otra dada mutación. Dicho fenómeno se conoce como epistasis. La epistasis entre dos mutaciones en la aptitud puede medirse como la diferencia entre la aptitud medida de la doble mutante y la aptitud esperada si los efectos de las mutaciones individuales fuesen aditivos [115,116]:

$$\varepsilon(X, Y) = W(X + Y) - W(X) \times W(Y)$$

Ecuación 1: Definición de epistasis (ε) en la aptitud (W) entre dos mutaciones X e Y.

$W(X+Y)$ es la aptitud para la doble mutante con las mutaciones X e Y, $W(X)$ es la aptitud para la variante con la mutación X y $W(Y)$ es la aptitud para la variante con la mutación Y. La aptitud (W) se expresa en forma relativa a la enzima silvestre.

En la Figura 16 se describen esquemáticamente los distintos tipos de epistasis. Las interacciones entre dos mutaciones pueden clasificarse como epistasis de magnitud o epistasis de signo [117]. La epistasis de magnitud se da cuando el cambio en el valor en la aptitud asociado a una mutación depende del contexto genético en el que aparece, pero no su signo. Si el valor de aptitud de la doble mutante es más alto o más bajo que el esperado, la epistasis de magnitud es positiva o negativa respectivamente. Por otro lado, la epistasis de signo se refiere a los casos en los cuales el signo del cambio en aptitud provocado por la mutación depende del contexto genético, es decir, la mutación es beneficiosa en un contexto y deletérea en otro. Un caso particular de epistasis de signo, la epistasis de signo recíproca, se da cuando el efecto de ambas mutaciones cambia de signo cuando aparecen juntas.

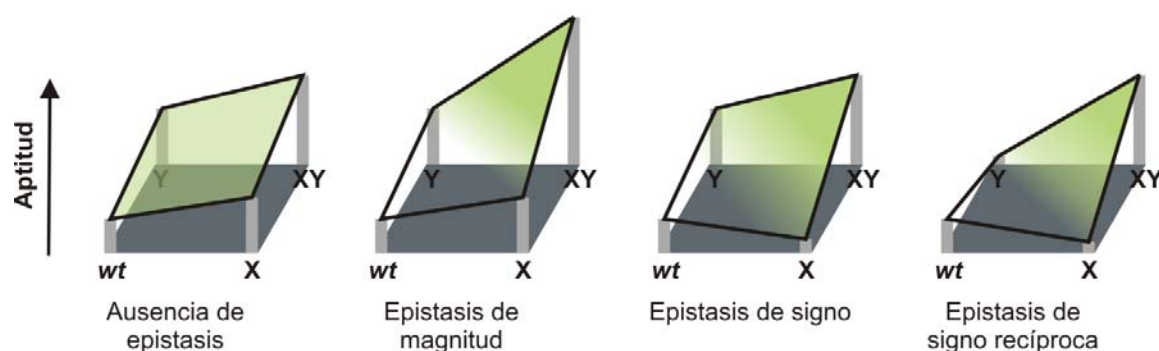


Figura 16: Representación esquemática de la epistasis entre mutaciones y la accesibilidad de caminos adaptativos.

A partir de una proteína silvestre (wt) pueden introducirse las mutaciones simples Y o X, y a partir de estas llegar a la doble mutante XY. La altura de las barras grises representa el valor de aptitud. Las líneas negras indican el camino desde un genotipo al otro. Cuando estas líneas tienen pendiente positiva, los caminos son adaptativos, es decir, accesibles ante selección positiva. Adaptado de [117].

Las interacciones epistáticas cumplen un rol central en la evolución adaptativa dado que determinan la rugosidad del “paisaje de aptitud” y la accesibilidad de caminos adaptativos a través del paisaje. Por ejemplo, dada una mutación Y beneficiosa y una mutación X deletérea en el contexto silvestre (wt), si existe epistasis de signo de manera que la doble mutante XY presenta un aptitud mayor al de la mutante Y (véase el caso en la Figura 16), sólo se podrá acceder a ese punto por el camino wt->Y->XY, pero no por el camino wt->X->XY, salvo que temporalmente hubiese una disminución en la presión de selección ambiental [114]. De esta manera, debido a la rugosidad del paisaje, los trayectos evolutivos pueden frenarse en picos sub-óptimos de aptitud. Weinreich y colaboradores claramente demostraron este fenómeno al analizar todos los trayectos evolutivos

posibles hacia una variante evolucionada de la enzima serin-β-lactamasa TEM-1, y encontrar que sólo 18 de 120 trayectos posibles son accesibles para la evolución adaptativa [40].

4.1.2 Paisaje de aptitud en metalo-β-lactamasas

En este capítulo nos proponemos explorar los factores que moldean el paisaje de aptitud de las metalo-β-lactamasas. Para ello se utilizó como modelo de estudio la enzima BclI y variantes optimizadas obtenidas previamente en el laboratorio mediante Evolución Molecular Dirigida [70]. En el proceso de Evolución Molecular Dirigida se empleó el método de mutagénesis al azar conocido como *DNA-Shuffling*. Para evaluar fenotípicamente el efecto de las mutaciones generadas, se utilizó el sistema de expresión descrito en la sección 2.1.1, en células de *E. coli*. La selección se realizó a través de la resistencia conferida frente al antibiótico β-lactámico cefalexina, el cual es un sustrato pobre para la enzima BclI-wt. Luego de cuatro rondas de mutagénesis y selección a concentraciones creciente de cefalexina, se obtuvo una variante de BclI con cuatro mutaciones (G262S, L250S, V112A, N70S) capaz de aumentar la resistencia frente a cefalexina 32 veces [70]. Esta variante, que nombraremos de aquí en más como GLVN, fue la encontrada con más frecuencia a altas concentraciones de cefalexina (mayor o igual a 768 µg/ml).

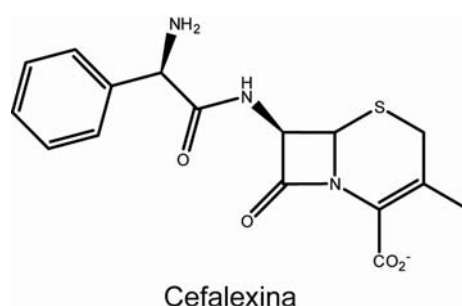


Figura 17: Estructura química de la cefalosporina cefalexina.

La cefalexina es una cefalosporina semisintética de primera generación, efectiva contra un amplio rango de bacterias gran-positivas y un reducido número de gran-negativas [118].

En el presente trabajo, tomamos este sistema como modelo para estudiar las características moleculares implicadas en la evolución de las MBLs. En este capítulo se describe el efecto de cada una de estas mutaciones y sus combinaciones en la aptitud. Para ello, se construyeron las 16 combinaciones posibles de las cuatro mutaciones encontradas en la variante GLVN y se evaluó la aptitud correspondiente como la resistencia conferida a células de *E.coli* frente al antibiótico cefalexina. Este diseño combinatorial, previamente empleado por Weinreich y col. en el caso de la serin-β-lactamasa TEM-1, permite explorar todos los caminos evolutivos,

inclusive aquellos que serían inaccesibles en la evolución adaptativa [40]. A su vez, permite indagar acerca de las interacciones entre mutaciones y brinda las bases para explorar luego cómo las propiedades moleculares de la proteína afectan la aptitud en los organismos que la expresan.

4.2 Resultados

4.2.1 Reconstrucción de los caminos evolutivos hacia la variante de BclI optimizada contra cefalexina y detección de interacciones epistáticas.

Se construyeron las 16 combinaciones posibles de las cuatro mutaciones (G262S, L250S, V112A, N70S) presentes en la variante de BclI GLVN. Los genes correspondientes a estas 16 combinaciones se clonaron en el plásmido pKP fusionados al péptido líder *pelb* para dirigir el exporte al periplasma. La aptitud correspondiente a cada variante se evaluó a través de la resistencia conferida a células de *E. coli* frente a cefalexina mediante medidas de concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs). En la Tabla 3 se muestra la nomenclatura que se utilizará para las variantes. En la Figura 18 se muestran los valores de CIMs correspondientes a cada variante a medida que se acumulan las mutaciones. De esta manera, puede observarse el efecto de cada mutación sobre diferentes contextos genéticos y la accesibilidad de los caminos posibles hacia el óptimo encontrado.

Tabla 3. Nomenclatura para las variantes de BclI según las mutaciones presentes.

Nombre de la variante de BclI	Mutaciones
G	G262S
L	L250S
V	V112A
N	N70S
GN	G262S/N70S
GL	G262S/L250S
GV	G262S/V112A
LV	L250S/V112A
LN	L250S/N70S
VN	V112A/N70S
GLN	G262S/L250S/N70S
GLV	G262S/L250S/V112A
GVN	G262S/V112A/N70S
GLVN	G262S/L250S/V112A/N70S

máximo nivel de resistencia encontrado en el experimento de Evolución Molecular Dirigida, correspondiente a una CIM de 1024 µg/ml.

A partir del análisis en base a la Ecuación 1 de los valores de CIMs para las mutantes simples, las mutantes dobles y las mutantes triples, se obtuvieron los valores de epistasis mostrados en la Figura 19 en el contexto silvestre y en el contexto de cada mutante simple. Se destacan dos casos de epistasis positivas que se mantienen en todos los contextos genéticos analizados: G262S-V112A y G262S-N70S, siendo este último un caso de epistasis de signo.

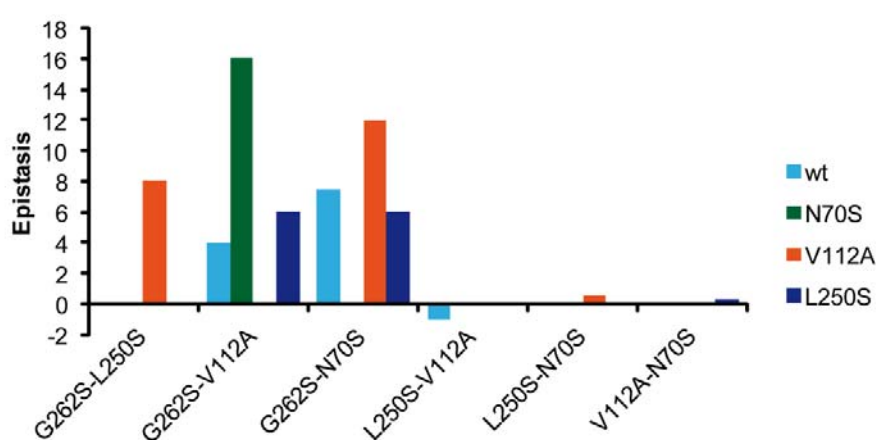


Figura 19: Epistasis entre las mutaciones G262S, L250S, V112A y N70S agrupadas de a pares en distintos contextos genéticos.

Se muestran los valores de epistasis en el contexto silvestre (wt) y de las mutantes N70S, V112A y L250S. En el contexto de G262S no existe epistasis entre las demás mutaciones. Los valores de epistasis se calcularon en base a la Ecuación 1 a partir de las CIMs para cefalexina de las mutantes simples, dobles y triples.

Los caminos posibles hacia el óptimo son $4! = 24$. Teniendo en cuenta que el experimento mediante el cual se obtuvo el óptimo se realizó bajo condiciones de alta presión de selección, y que naturalmente estas enzimas también están expuestas a una presión de selección sostenida por los distintos β-lactámicos en la clínica, consideramos como caminos accesibles aquellos que sólo incluyen mutaciones beneficiosas. De todos los caminos, 12 son interrumpidos en algún punto debido a una mutación que produce una disminución en la CIM (se indican en línea punteada en la Figura 18). Cabe destacar, que en 10 de los casos dicha mutación es N70S. La mutación V112A inicia 4 caminos que avanzan por pasos neutrales hasta la aparición de G262S, que sí produce un aumento en la CIM. Los 8 caminos restantes avanzan a través de sucesivas mutaciones beneficiosas, 2 de ellos se inician con la mutación L250S y 6 con la mutación G262S (pueden seguirse mediante las flechas verde de trazo continuo en la Figura 18). De esta manera, a

pesar de que la mutación L250S también es beneficiosa en el contexto de BclI-wt, G262S se destaca por definir los caminos accesibles.

4.2.2 Óptimos alternativos y diversificación de caminos.

Los caminos descritos en la sección anterior se construyeron en base a la variante encontrada con mayor frecuencia en el proceso de Evolución Molecular Dirigida a altas concentraciones de cefalexina (mayor o igual a 768 µg/ml). Sin embargo, otros clones fueron encontrados también en dicha condición, los cuales representan óptimos alternativos [69]. En el presente trabajo se revisaron los clones encontrados en los últimos pasos de selección y se determinaron sus CIMs para cefalexina. Las mutaciones encontradas en cada clon y sus respectivas CIMs se muestran en la Tabla 4.

Del análisis de estas combinaciones, surge que las mutaciones I46M y V259A actúan en los contextos GV y GVN dando lugar a aumentos en la CIM, por lo cual pueden dar lugar a ramificaciones en los caminos que lleven hacia óptimos distintos a GLVN. Las demás mutaciones parecen tener efectos neutrales. Puede observarse la presencia ubicua de las mutaciones G262S, V112A y N70S en aquellas variantes con valores de CIM de 1204 µg/ml. Es decir, que estas tres mutaciones en conjunto constituyen un nuevo contexto genético sobre el cual pueden fijarse varias mutaciones, dando lugar a múltiples picos en el paisaje de aptitud.

Tabla 4: Variantes distintas de GLVN seleccionadas a altas concentraciones de cefalexina y sus respectivas CIMs.

Mutante	Mutaciones en común con GLVN	Otras mutaciones	CIM para cefalexina (µg/ml)
M1	G262S/ V112A	V259A	512
M9	G262S/ V112A	V239I/ I246T/ I46M	512
M4	G262S/ V112A/ N70S	V259A/ T33A	512
M10	G262S/ V112A/ N70S	I246T	512
M11	G262S/ V112A/ N70S	V259A/ I246T	512
M2	G262S/ V112A/ N70S	V259A	1024
M3	G262S/ V112A/ N70S	I202V/ I46M	1024
M6	G262S/ V112A/ N70S	V259A/ R254G/ K32E	1024
M8	G262S/ V112A/ N70S	V259A/ R254G/ I46M/ T33A/ V30I	1024

4.3 Discusión

La elucidación de los principios que gobiernan la evolución molecular sigue siendo un tema central en la biología evolutiva. Desde el surgimiento de la teoría neutral de la evolución, muchos de los estudios han focalizado sus esfuerzos en descifrar el papel de la contribución de la selección *versus* la contribución de la deriva genética en la fijación de sustituciones aminoacídicas. Estudios recientes han demostrado que la epistasis es un factor que afecta la evolución de proteínas a largo plazo y que debe ser tomada en cuenta para explicar por qué la gran mayoría de las sustituciones aminoacídicas que ocurren en una especie no pueden ocurrir en otra, más allá que la selección positiva juegue o no un rol dominante [119]. En el caso de proteínas, se ha visto con diversos ejemplos que la epistasis entre mutaciones condiciona los caminos adaptativos posibles desde una versión de la proteína hacia otra con nuevas características en su función [40,41,120–123].

Respecto al tratamiento de enfermedades infecciosas, la introducción de agentes terapéuticos resulta en una presión de selección fuerte que lleva a que las proteínas implicadas en la supervivencia del microorganismo experimenten una rápida evolución [39,121,124,125]. En este contexto, nos propusimos estudiar los mecanismos subyacentes en la evolución de la resistencia a antibióticos β -lactámicos mediada por las MBLs. Para ello se tomó como modelo una variante de la MBL BclI obtenida previamente en el laboratorio, GLVN, que presenta cuatro mutaciones, G262S, L250S, V112A y N70S. La mutación G262S se destaca por ser responsable de un incremento considerable en la capacidad de la enzima de conferir resistencia. A su vez, G262S resulta en un contexto genético favorable para que puedan seleccionarse otras mutaciones con las cuales presenta epistasis positiva: N70S y V112A. De esta manera, G262S prevalece como mutación iniciadora de los caminos adaptativos hacia el óptimo. Asumiendo un escenario de fuerte presión de selección, no sería posible que se inicien caminos a través de la mutación N70S, dado que es deletérea en el contexto silvestre. La mutación V112A es neutral, por lo que, si bien esta mutación podría fijarse por deriva génica, los caminos iniciados por V112A tienen menos probabilidad de ocurrir que los iniciados por G262S. Vemos entonces cómo las interacciones epistáticas, restringen el orden en que pueden ocurrir las mutaciones, y por ello la accesibilidad de los caminos hacia un dado óptimo.

De Visser y colaboradores han demostrado que la elección particular de caminos evolutivos es dependiente del primer paso mutacional debido a la epistasis [41]. Este fenómeno

también se evidencia en nuestro escenario, siendo esta mutación iniciadora de caminos G262S. Cabe destacar que la mutación G262S se ubica en una región de secuencia altamente conservada en las MBLs, donde prevalece el residuo de Gly. Uno de los pocos casos en los que se encuentra reemplazada por Ser es en variantes de la enzima IMP, como se describió en la sección 1.5.2. En las variantes IMP, este cambio provoca variaciones en el perfil de sustrato [66]. Es decir, que mediante Evolución Molecular Dirigida pueden señalarse posiciones en la secuencia de las MBLs que son clave para el perfil de sustrato de la enzima, y por ello, pueden variar según la presión de selección.

Por otro lado, observamos que a partir de la variante triple GVN pueden acumularse otras mutaciones diferentes a L250S dando lugar a óptimos alternativos. Esto, sumado a la evidencia de la existencia de interacciones epistáticas entre G262S-V112A y G262S-N70S indica que V112A y N70S tienen un fuerte efecto en el aumento de aptitud en el contexto de G262S. En cambio, L250S sólo tiene efecto aditivo y otras sustituciones pueden aparecer en su lugar. Es decir, que una vez que se seleccionan las mutaciones relacionadas epistáticamente: G262S, V112A y N70S, se crea un nuevo contexto genético que resulta favorable para la acumulación de nuevas mutaciones. De esta manera, a partir de la triple mutante GVN se multiplican los caminos alternativos hacia óptimos, y dando lugar a un pico ancho y rugoso en el paisaje de aptitud.

Las interacciones epistáticas observadas a nivel de la aptitud ocurren debido a que las mutaciones implicadas afectan simultáneamente propiedades moleculares de la proteína [40]. Nos encontramos entonces en nuestro caso con el interrogante de identificar cuáles son dichas propiedades moleculares responsables de las interacciones epistáticas y, por lo tanto, de delinear los caminos accesibles. El objetivo del próximo Capítulo es la caracterización de las distintas propiedades moleculares que contribuyen a la aptitud de las distintas mutantes, y su interrelación.

Capítulo 5. Contribución de las propiedades moleculares en la capacidad de conferir resistencia de las metalo- β -lactamasas

5.1 Introducción

El desafío central en el estudio de la evolución de proteínas es tratar de correlacionar los cambios a nivel molecular de la proteína con el fenotipo del organismo que la expresa [116,126]. La comprensión de estos mecanismos es una herramienta importante para racionalizar y anticipar la rápida evolución de los mecanismos de resistencia de microorganismos frente los agentes terapéuticos. A pesar de los numerosos trabajos realizados en el campo de evolución de proteínas, descifrar como se relacionan estos fenómenos sigue siendo una tarea compleja, dado que muchas veces las caracterizaciones *in vitro* de las proteínas no son representativas de los fenómenos observados *in vivo* [127,128].

El impacto a nivel fenotípico de las mutaciones puede estar condicionado por las interacciones epistáticas. Las interacciones epistáticas entre mutaciones se dan cuando éstas tienen efectos pleiotrópicos y superpuestos sobre distintas propiedades moleculares de la proteína [40]. En varios ejemplos relacionados con la resistencia a agentes antimicrobianos se han encontrado casos de epistasis donde una mutación da lugar a una ventaja funcional para la proteína, ya sea un aumento de actividad frente a algún sustrato o una menor afinidad por un inhibidor; en detrimento de alguna otra propiedad, como la estabilidad proteica o la actividad enzimática contra su sustrato natural. En ese contexto, suele requerirse la aparición de otra mutación capaz de revertir el fenotipo de la propiedad afectada negativamente, que permita mantener los beneficios de la primera, lo que redundará en un incremento en la aptitud. El clásico ejemplo es el de la enzima TEM-1, donde una mutación que incrementa la actividad contra las cefalosporinas de tercera generación, G238S, y en forma concomitante la capacidad de conferir resistencia, produce a su vez una disminución en la estabilidad. Otra mutación, M182T, que tiene escaso efecto en la aptitud en el contexto silvestre, restaura la estabilidad en el contexto de la mutación G238S, dando lugar a un aumento en la resistencia [37](ver Figura 2). A este tipo de mutaciones se las denomina “compensatorias”. La mutación M182T se encuentra alejada en la estructura de G238S y puede actuar como compensatoria en el contexto de otras mutaciones desestabilizadoras, por lo cual se la denomina “supresor global” [129]. Dentro de las variantes de TEM-1, también se han encontrado otros supresores globales, y se ha visto incluso que muchos de

estos casos corresponden a sustituciones que restituyen la secuencia consenso ancestral [44]. En algunos de los casos se ha demostrado que esta estabilización tiene lugar a nivel termodinámico [37,130]; mientras que en otros se ha relacionado con factores cinéticos [44,131].

Otros ejemplos que han sugerido o demostrado el mismo tipo de interacciones mediadas por la estabilidad son la proteína ADN girasa B de *E.coli*, la proteasa de HIV-1 y una nucleoproteína del virus de influenza. La proteína ADN girasa B es el blanco de acción de antibióticos como quinolonas y cumarinas. Por selección de resistencia espontánea a cumarinas se encontró una mutación que confiere resistencia pero produce un fenotipo de termosensibilidad. Utilizando un procedimiento de selección *in vivo* se encontraron dos mutaciones supresoras del fenotipo de termosensibilidad, manteniendo el fenotipo de resistencia [125]. Estos efectos estarían relacionados con la estabilidad de la proteína, aunque las conclusiones sólo están basadas en mediciones de fracción de proteína soluble tras la sobreexpresión de las mismas, correlacionadas con fenotipos a distintas temperaturas.

En el caso de la proteasa del virus HIV-1, se han encontrado numerosas mutaciones que dan resistencia a los inhibidores de proteasas, los cuales son componentes clave de la terapia antirretroviral [132]. El desarrollo de resistencia involucra múltiples mutaciones en el sitio activo de la enzima y la periferia. Mutaciones cercanas al sitio activo disminuyen la unión de inhibidores en general a costa de la actividad contra el sustrato, la cual se puede recuperar a través de mutaciones más distantes [132]. A su vez, a partir del análisis de aislados clínicos se identificaron mutaciones que por estar alejadas del sitio activo parecían accesorias, pero que son capaces de restablecer la estabilidad de la proteasa a niveles similares o mayores a los de la enzima silvestre [124].

En un trabajo reciente se analizó la evolución de la nucleoproteína del virus de influenza humano H3N2, la cual ha acumulado 39 mutaciones entre el año 1968 y 2007, relacionadas en general con el escape del sistema inmune. Dado que se cuenta con información cronológica de la aparición de las distintas mutaciones, se pudo reconstruir el trayecto evolutivo más probable entre de todos los caminos posibles. Al evaluar el efecto de las mutaciones individuales sobre el gen parental, se encontró que varias mutaciones son deletéreas en el gen parental, a pesar de haber sido fijadas durante la evolución sin impactos negativos. Estas mutaciones son

desestabilizadoras, y fueron precedidas o acompañadas por mutaciones estabilizadoras aliviando sus efectos adversos [120].

En el Capítulo 4 analizamos el efecto de cuatro mutaciones en la MBL BclI que dan lugar a un fenotipo de resistencia aumentada contra cefalexina. Una de las cuatro mutaciones, G262S, produce un incremento marcado en la resistencia. Otras dos, V112A y N70S, presentan epistasis positiva con G262S, siendo beneficiosas en su contexto, aunque no en el silvestre. Este hecho sugiere que en algún punto estos pares de mutaciones superponen sus efectos sobre propiedades de la enzima.

Los residuos G262 y N70 forman parte de la denominada segunda esfera de coordinación del sitio activo. Los residuos de la segunda esfera forman redes de puentes hidrógeno entre la proteína y los ligandos del metal, capaces de alterar el sitio de coordinación de diversas maneras, afectando en forma indirecta la estructura electrónica y la geometría de los iones Zn(II) [133]. Es lógico esperar entonces que las mutaciones G262S y N70S tengan algún efecto en la catálisis o en la unión del Zn(II). En nuestro grupo se demostró que la mutación G262S produce un aumento marcado en la eficiencia catalítica contra cefalexina, acompañado de una disminución de la estabilidad termodinámica de la proteína [70,134]. Respecto a la mutación N70S, se descartó que cumpliera un rol compensatorio respecto a la estabilidad termodinámica [134]. A partir de la estructura cristalográfica de la mutante GLVN, se infirió que el efecto de la mutación N70S podría estar relacionado con un aumento en la flexibilidad de los bucles que rodean el sitio activo. Por otro lado, la mutación V112A está situada en un carozo hidrofóbico en la estructura proteica y no participa en la segunda esfera de coordinación (Figura 20). No obstante, su ubicación distante del sitio activo hace más difícil de racionalizar su efecto.

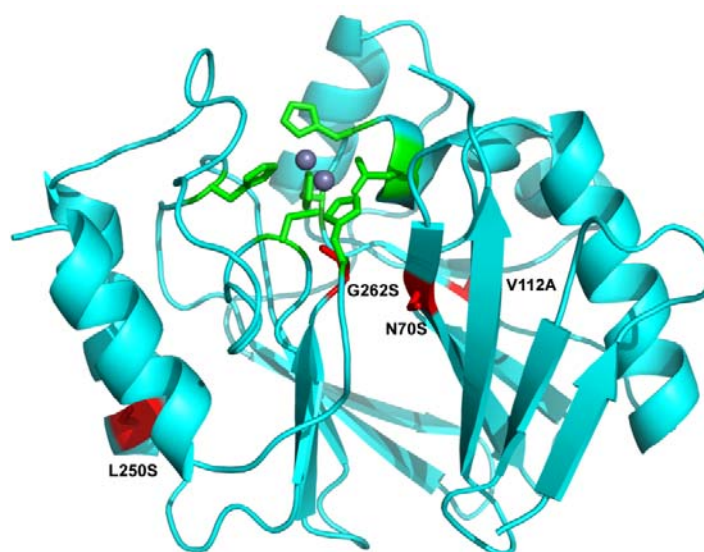


Figura 20: Estructura cristalográfica de la mutante GLVN.

Representación de la estructura cristalográfica de la mutante GLVN, (PDB 3FCZ)[134]. Se indican en verde los residuos ligando del sitio activo, las esferas grises representan los iones Zn(II) y se muestran en rojo los residuos mutados.

Debido al rol central encontrado en el Capítulo 4 para la mutación G262S en definir los caminos adaptativos (Figura 18), nos focalizamos en la caracterización funcional y biofísica *in vitro* de las variantes que presentan dicha mutación: G, GV, GL, GN, GLV, GLN, GVN y GLVN. Se realizaron estudios complementarios *in vitro* y con extractos periplasmáticos con el fin de analizar cómo las propiedades de eficiencia catalítica, estabilidad y afinidad por el cofactor Zn(II) entran en juego para definir la aptitud.

5.2 Resultados

5.2.1 Caracterización cinética *in vitro* de las variantes de BcII que contienen la mutación G262S junto con las distintas combinaciones de N70S, V112A y L250S.

Para realizar la caracterización cinética de las variantes que contienen la sustitución G262S se procedió en primer lugar a la optimización de las condiciones de sobreexpresión y purificación de estas proteínas. Se utilizó el sistema de sobreexpresión puesto a punto en el laboratorio para BcII-wt. El plásmido empleado, pET-TERM, permite expresar la enzima β -lactamasa fusionada en su extremo amino a la proteína GST mediante inducción con IPTG en células de *E. coli*. Para BcII-wt, la inducción de la expresión se realiza a 37° durante 4 hs. En los primeros intentos de purificación de las variantes observamos dificultades en la obtención de preparaciones estables y

con una relación aceptable de equivalentes de Zn(II)/molécula de proteína (mayores o iguales a 1,4). En particular, encontramos que la mutante triple GLN se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble luego de realizar la ruptura celular por sonicación. Estos inconvenientes fueron superados realizando la inducción a baja temperatura (20 °C) durante 16 hs y con exceso de Zn(II) en el medio de cultivo (mediante el agregado de ZnSO_4 500 μM). También fue necesario un extremo cuidado durante la manipulación de las muestras, manteniendo una temperatura de 4°C durante todos los pasos de la purificación. La proteína de fusión se separó del extracto crudo utilizando la resina de afinidad GSH-agarosa, luego se procedió al corte con trombina y la proteína de interés se aisló mediante una resina de intercambio iónico CM-Sefarosa.

El estado de plegamiento proteico se evaluó mediante espectroscopia de dicroísmo circular. Se realizaron espectros en la región UV-lejano y UV-cercano para evaluar el estado de la estructura secundaria y estructura terciaria respectivamente. Debido a que ninguna de las mutaciones involucra residuos aromáticos, los espectros de UV-cercano sirven como una huella dactilar del plegamiento de las distintas variantes. Como se muestra en la Figura 21, en todos los casos los espectros de las variantes son muy similares a los espectros de la enzima BclI-wt, lo cual sugiere que no existen cambios drásticos en el plegamiento.

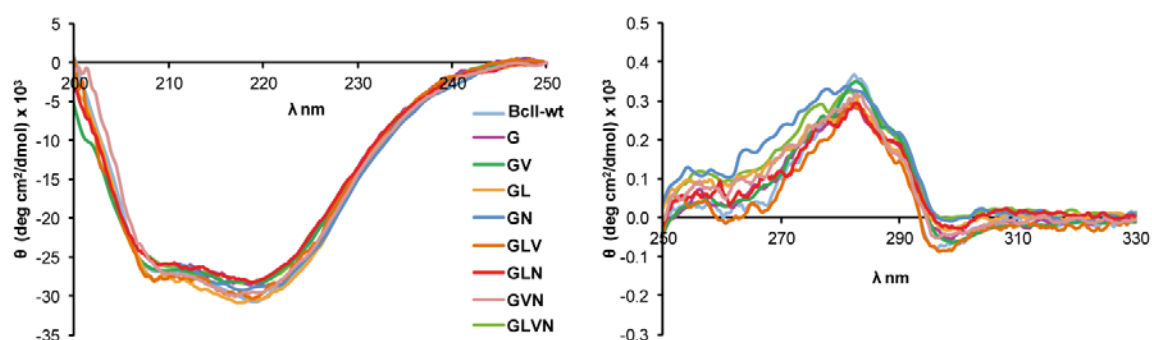


Figura 21: Evaluación del estado de plegamiento de las variantes de BclI mediante espectroscopia de dicroísmo circular.

Los espectros correspondientes a la región del UV-lejano (izquierda) y los correspondientes al UV-cercano (derecha), demuestran que la estructura secundaria y terciaria, respectivamente, están conservadas en las variantes respecto a BclI-wt.

La medición del contenido de Zn(II) de las preparaciones de MBLs purificadas permite estimar la calidad de las mismas. Se ha visto que las preparaciones de apo-proteínas captan la misma cantidad de metal con la que fueron aisladas, es decir que aquella fracción que no une Zn(II) durante la expresión sufre algún cambio irreversible que le imposibilita tomar más metal y

activarse [81]. Dicho de otra manera, los eq. de Zn(II)/molécula de enzima nos permiten inferir la fracción de proteína capaz de captar metal, y por lo tanto, activa, en una preparación. En general, se consideran aceptables valores a partir de 1,4-1,5 eq. de Zn(II)/molécula de proteína, lo cual correspondería a un 70-75% de proteína nativa. Para realizar estas medidas se utilizó el método de desnaturalización de la proteína por el agregado de cloruro de guanidinio y el agregado del quelante colorimétrico PAR que capta el metal liberado (sección 2.12.1). En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos en promedio en las preparaciones de las variantes.

Tabla 5. Determinación del contenido de Zn(II) para las preparaciones de proteína pura.

Variante	Equivalentes de Zn(II)/molécula de proteína
wt BclI	1,6 ± 0,1
G	1,5 ± 0,1
GV	1,6 ± 0,1
GL	1,7 ± 0,1
GN	1,7 ± 0,1
GLV	1,5 ± 0,1
GNL	1,7 ± 0,1
GVN	1,7 ± 0,1
GLVN	1,4 ± 0,1

Los parámetros cinéticos en estado estacionario se midieron en las condiciones típicamente empleadas para las enzimas MBLs [70,78], que incluyen el agregado de Zn(II) en el medio de reacción. Las medidas se realizaron para el sustrato empleado en el proceso de evolución molecular dirigida, cefalexina; y para sustratos representativos de penicilinas: penicilina G, carbapenemes: imipenem y cefalosporinas: cefotaxima. Estos tres sustratos son eficientemente hidrolizados por la enzima silvestre. Se estudió además la eficiencia hidrolítica frente a ceftazidima, una cefalosporina que, al igual que cefalexina, es pobremente hidrolizada por la enzima silvestre y cuya hidrólisis, según datos previos, también se veía aumentada en la variante optimizada [70]. Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos en estado estacionario para BcII-wt y sus variantes.

	k_{cat} (s^{-1})				
	Cefalexina	Cefotaxima	Ceftazidima	Penicilina G	Imipenem
wt	4,15 \pm 0,2	101 \pm 21	> 25	1275 \pm 64	349 \pm 17
G	256 \pm 10	397 \pm 21	> 160	589 \pm 22	56,2 \pm 2,1
GV	263 \pm 11	354 \pm 5,6	ND	1077 \pm 20	67,7 \pm 2,2
GL	344 \pm 7,6	490 \pm 6,2	ND	1184 \pm 32	118 \pm 3,1
GN	347 \pm 10	236 \pm 3,3	> 100	1303 \pm 22	85,1 \pm 2,3
GLV	337 \pm 6,7	404 \pm 5,3	ND	1233 \pm 25	143 \pm 4,0
GNL	251 \pm 6,0	315 \pm 17	ND	977 \pm 33	86,1 \pm 2,8
GVN	297 \pm 9,5	291 \pm 4,1	> 200	1538 \pm 62	73,2 \pm 1,3
GLVN	359 \pm 5,7	300 \pm 5,1	> 180	1380 \pm 33	93,8 \pm 4,0
	K_M (μM)				
	Cefalexina	Cefotaxima	Ceftazidima	Penicilina G	Imipenem
wt	125 \pm 13	43,3 \pm 4,0	>1000	662 \pm 66	687 \pm 9,0
G	140 \pm 19	53,8 \pm 3,4	> 1000	194 \pm 14	76,8 \pm 8,5
GV	114 \pm 17	40,5 \pm 2,7	ND	214 \pm 20	70,1 \pm 8,5
GL	142 \pm 12	56,9 \pm 2,4	ND	215 \pm 18	70,7 \pm 5,9
GN	139 \pm 12	31,6 \pm 2,4	> 300	256 \pm 18	41,8 \pm 5,9
GLV	134 \pm 12	65,8 \pm 4,7	ND	129 \pm 12	68,8 \pm 8,4
GNL	97 \pm 9,0	42,7 \pm 7,5	ND	234 \pm 28	53,5 \pm 6,5
GVN	121 \pm 14	52,1 \pm 2,9	> 400	379 \pm 46	44,4 \pm 4,6
GLVN	160 \pm 10	42,8 \pm 3,7	> 600	294 \pm 29	75,9 \pm 7,6
	k_{cat}/K_M (μM)				
	Cefalexina	Cefotaxima	Ceftazidima	Penicilina G	Imipenem
wt	0,033 \pm 0,004	2,32 \pm 0,26	\sim 0,025	1,93 \pm 0,21	0,51 \pm 0,06
G	1,83 \pm 0,26	7,39 \pm 1,17	\sim 0,16	3,04 \pm 0,40	0,73 \pm 0,09
GV	2,30 \pm 0,35	8,74 \pm 0,75	ND	5,04 \pm 0,34	0,97 \pm 0,12
GL	2,41 \pm 0,21	8,62 \pm 0,42	ND	5,49 \pm 0,53	1,67 \pm 0,21
GN	2,52 \pm 0,23	7,45 \pm 0,58	\sim 0,30	5,08 \pm 0,36	2,03 \pm 0,29
GLV	2,51 \pm 0,23	6,14 \pm 0,45	ND	9,56 \pm 0,91	2,07 \pm 0,26
GNL	2,60 \pm 0,25	7,38 \pm 1,35	ND	4,17 \pm 0,52	1,61 \pm 0,29
GVN	2,45 \pm 0,29	5,58 \pm 0,32	\sim 0,50	4,05 \pm 0,52	1,65 \pm 0,17
GLVN	2,24 \pm 0,14	7,01 \pm 0,62	\sim 0,30	4,70 \pm 0,48	1,24 \pm 0,13

Las reacciones se llevaron a cabo en solución amortiguadora 10 mM Hepes; pH 7,5; 200 mM NaCl; 20 μM ZnSO₄ and 0,05 mg/ml albúmina sérica bovina a 30 °C. Los valores indicados corresponden al promedio de al menos dos repeticiones \pm el error estándar. ND: no determinado.

Las 8 variantes muestran un incremento de entre 55 y 70 veces de la eficiencia hidrolítica contra cefalexina comparada con BcII-wt (Figura 22). Los valores de k_{cat}/K_M para estas mutantes

están en el rango de $1,8-2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (en contraste con $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para BcII-wt). El aumento en actividad se debe principalmente a un aumento en k_{cat} . Vemos que el aumento en la eficiencia hidrolítica se produce a causa de la mutación G262S, mientras que las demás sustituciones, en presencia de G262S, no tienen efectos considerables sobre la misma.

Para los sustratos penicilina G, imipenem y cefotaxima, se observan en general aumentos menores a un orden de magnitud. Para penicilina G e imipenem los cambios se deben principalmente a disminuciones en la K_M ; mientras que para cefotaxima, al igual que en cefalexina, se deben principalmente a aumentos en k_{cat} . En el caso de ceftazidima, se midieron los parámetros cinéticos solamente para las variantes G, GN, GVN y GLVN. Si bien los parámetros individuales k_{cat} y K_M no pueden determinarse por ser el valor de K_M muy alto, la estimación de k_{cat}/K_M muestra aumentos en la actividad respecto a BcII-wt de entre 6-30 veces.

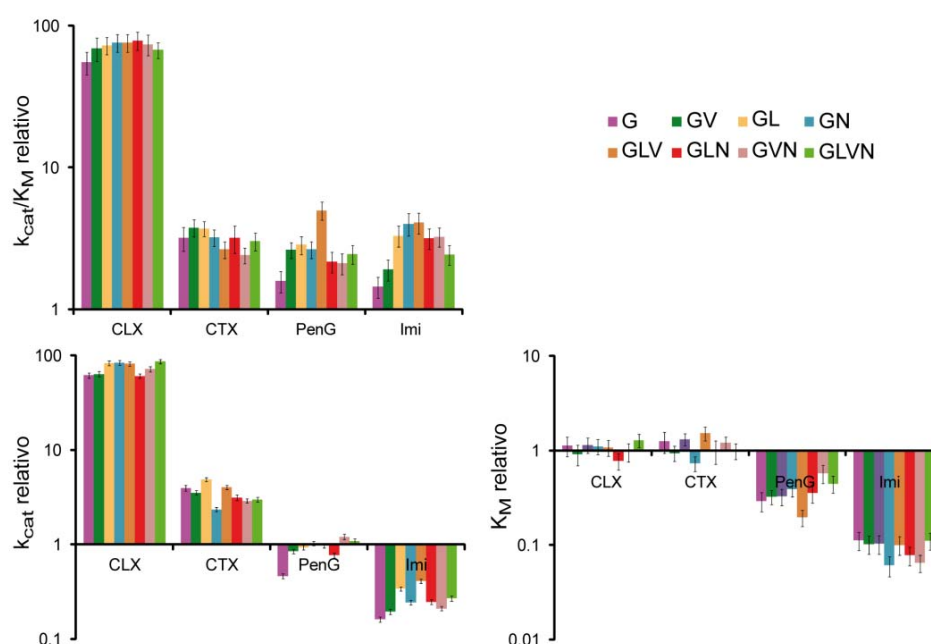


Figura 22: Parámetros cinéticos frente a distintos antibióticos β-lactámicos para las variantes de BcII relativos a la enzima silvestre.

Se muestran los parámetros indicados en la Tabla 6 relativos a BcII-wt en escala logarítmica para cada sustrato. PenG: penicilina G, IMI: imipenem, CTX: cefotaxima, CLX: cefalexina.

Globalmente, se observa que los cambios en eficiencia hidrolítica se deben a la sustitución G262S. El efecto es más marcado para cefalexina, lo cual es razonable debido a que fue el antibiótico utilizado como selector en el experimento de Evolución Molecular Dirigida. El aumento

en eficiencia hidrolítica contra cefalexina explica el incremento en CIM en el caso de la mutación G262S. En cambio, las variaciones en eficiencia hidrolítica observadas con las demás sustituciones no muestran ninguna correlación con los aumentos sucesivos en CIM. Esto sugiere que las demás sustituciones afectan otra u otras propiedades que son relevantes para la determinación de la aptitud o que ejercen efectos sutiles en la eficiencia hidrolítica que no son detectados con la metodología empleada. De hecho, las condiciones empleadas para las medidas podrían no estar representando adecuadamente el estado de las proteínas en el periplasma bacteriano. Nos planteamos entonces la necesidad de obtener parámetros de actividad en extractos periplasmáticos.

5.2.2 Medidas de actividad en extractos periplasmáticos y correlación con parámetros de resistencia.

Con el propósito de tener una medida de la actividad enzimática en condiciones más cercanas a las de la proteína durante los ensayos de resistencia, se obtuvieron extractos de periplasma de células de *E. coli* expresando las distintas variantes. Se probaron distintos métodos de extracción en búsqueda de reproducibilidad y de la conservación de actividad de las enzimas. Se trabajó con el método de choque osmótico modificado (evitando el uso de EDTA), como se describe en la sección 2.7. Se realizaron también pruebas confirmatorias de las actividades medidas con otro método, el de extracción con cloroformo.

Como primera aproximación, se realizaron medidas de actividad contra cefalexina en condiciones de concentración de sustrato saturante (basándonos en los valores de K_M determinados con enzimas puras). La cantidad de enzima en cada extracto se determinó por cuantificación de la banda correspondiente en geles SDS-PAGE utilizando como calibración interna cantidades conocidas de BclI pura (la identidad de la banda se verificó por *Western Blot*, ver sección 2.8 y Figura 26 A). Los valores de velocidades iniciales se dividieron por la cantidad de enzima en la mezcla de reacción para estimar la actividad específica en periplasma. En la Figura 23 se muestran las actividades específicas para todas las variantes. En el caso del extracto correspondiente a la enzima BclI-wt, la actividad fue prácticamente indetectable, al igual que para las variantes que no contienen la mutación G262S: V, L, LV, LN, VN y LVN. Para el caso de la variante G, la actividad aumenta hasta alrededor de 100 s^{-1} , y ante la adición de las demás sustituciones la actividad sigue aumentando hasta casi 400 s^{-1} en la variante GLVN.

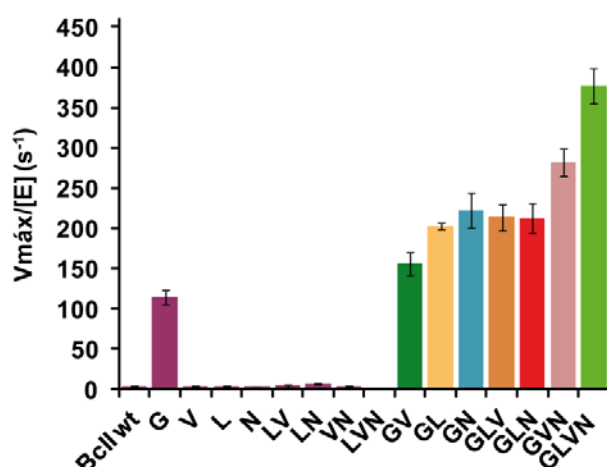


Figura 23: Actividad específica determinada en extractos periplasmáticos para BclI-wt y sus variantes.

Se obtuvieron extractos periplasmáticos de células de *E. coli* expresando cada una de las variantes y se midió la velocidad inicial de reacción contra cefalexina a concentración saturante (400 μM). La cantidad de enzima en cada extracto se determinó mediante la cuantificación por densitometría a partir de la banda correspondiente en geles SDS-PAGE (confirmando la identidad de la banda por *Western Blot*). Las velocidades obtenidas se dividieron por la cantidad de enzima en la reacción para obtener el parámetro $V_{\text{máx}}^{\text{aparente}}/[E]$. Esto se realizó 3 veces para cada variante con preparaciones de periplasma independientes. Las reacciones se llevaron a cabo en solución amortiguadora 10 mM HEPES; 200 mM NaCl; pH 7,5 a 30 °C.

Dado que en general los valores de actividad específica determinados en periplasma presentan una tendencia que se corresponde con los valores de CIMs, se profundizó en la caracterización de las variantes que contienen la sustitución G262S. Se realizaron entonces medidas de actividad a distintas concentraciones de cefalexina. Para todos los casos se observó un comportamiento del tipo Michaelis-Menten de la cinética en estado estacionario (Figura 24). Esto nos permitió realizar estimaciones de k_{cat} y $K_{\text{M}}^{\text{aparentes}}$ en los extractos periplasmáticos (Tabla 7)

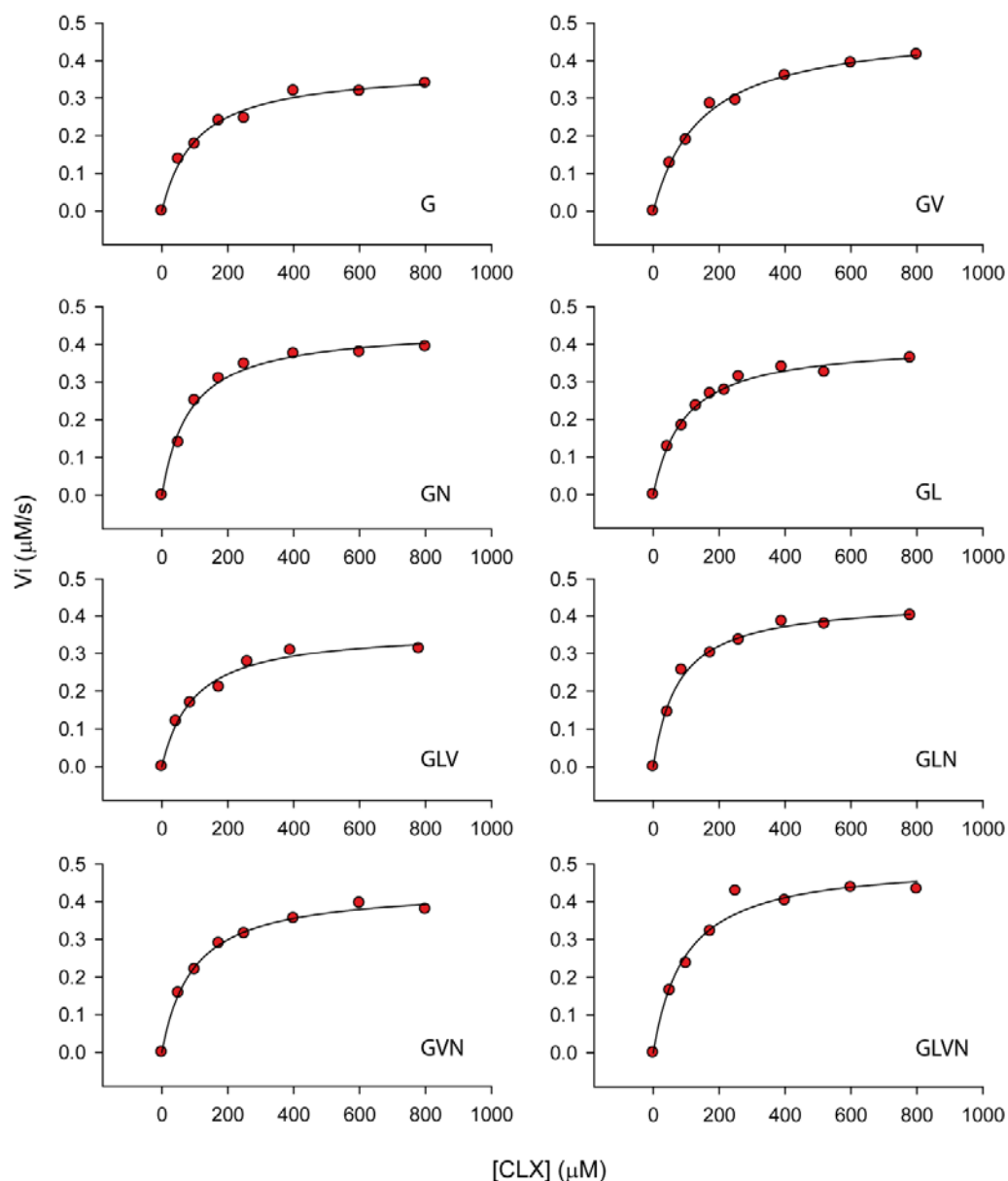


Figura 24: Curvas de velocidad inicial versus concentración de sustrato en extractos periplasmáticos para las variantes de BclI.

Las reacciones se llevaron a cabo a distintas concentraciones del sustrato cefalexina, en solución amortiguadora 10 mM Hepes; 200 mM NaCl; pH 7,5 a 30 °C y concentraciones de enzima β -lactamasa en los extractos periplasmáticos de entre 0,9 y 2 nM.

Tabla 7. Parámetros cinéticos aparentes para el sustrato cefalexina determinados con extractos periplasmáticos de BclI-wt y sus variantes.

	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)
BclI-wt	~4	ND	~ 10^4
G	129 ± 21	101 ± 4	$1,3 \pm 0,2$
GV	174 ± 13	116 ± 31	$1,5 \pm 0,6$
GL	$217 \pm 2,3$	$96 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,02$
GN	224 ± 30	$85 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,3$
GLV	234 ± 42	$96 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,4$
GLN	$228 \pm 1,0$	$78 \pm 1,5$	$2,9 \pm 0,1$
GVN	323 ± 37	$92 \pm 0,9$	$3,5 \pm 0,4$
GLVN	392 ± 31	$100 \pm 3,3$	$3,9 \pm 0,4$

Las reacciones se llevaron a cabo en solución amortiguadora 10 mM Hepes; 200 mM NaCl; pH 7,5 a 30 °C. Los valores mostrados son el promedio de al menos 2 determinaciones realizadas con extractos periplasmáticos independientes \pm el error estándar

En la Figura 25 se muestran graficados los valores de k_{cat}/K_M *aparentes* en comparación con los valores de k_{cat}/K_M obtenidos con las proteínas puras. Puede observarse que existe una tendencia de aumento en k_{cat}/K_M *aparente* en el periplasma desde la mutante G hasta GLVN, que correlaciona con los valores de CIMs correspondientes (Figura 18).

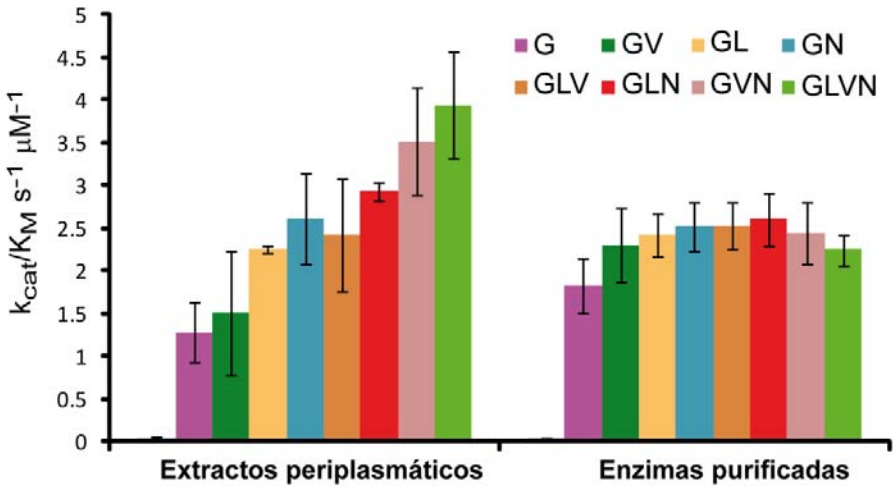


Figura 25: Parámetros cinéticos aparentes determinados en periplasma en comparación con los parámetros cinéticos determinados con las enzimas purificadas.

Los parámetros cinéticos determinados con los extractos periplasmáticos corresponden a los datos mostrados en la Tabla 7 y los de las enzimas purificadas a los datos mostrados en la Tabla 6.

Luego de realizar 3 repeticiones de preparaciones periplasmáticas para cada variante, se estimaron las cantidades de proteína para cada una relativas a BcII-wt como se describe en la sección 2.8 y en la Figura 26 A. Los resultados en promedio de estas determinaciones se muestran en la Figura 26 B. En la Figura 27 se muestran las preparaciones correspondientes a células totales y extractos periplasmáticos resueltas por SDS-PAGE y sus correspondientes ensayos de *Western Blot* para todas las variantes en paralelo. Se observó que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión entre las variantes. Esto indica que las diferencias en CIMs no están relacionadas con diferencias en los niveles de expresión.

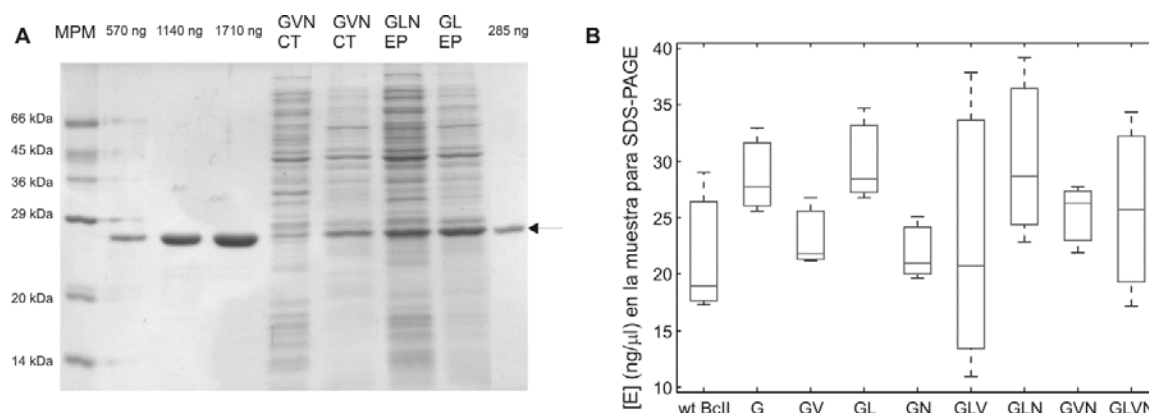


Figura 26: Cantidades de enzima exportada al periplasma de *E. coli* relativa a BcII-wt.

A) Se prepararon extractos de células totales y extractos periplasmáticos a partir de *E. coli* XL1-Blue expresando BcII-wt o cada una de las variantes. Se sembraron cantidades adecuadas de periplasma concentrado para su visualización y cantidades conocidas de proteína pura para construir una curva de calibración interna. La flecha indica la posición de la banda correspondiente a BcII. MPM: marcador de peso molecular, CT: células totales, EP: extracto de periplasma. La densidad óptica de cada banda se determinó con el programa GelAnalyzer. La identidad de la banda se corroboró mediante los ensayos de *Western Blot*. La cuantificación se realizó tres veces para cada variante con extractos periplasmáticos independientes. B) Diagrama de caja y bigotes representando los promedios y desviaciones estándar obtenidos para cada variante. Mediante una prueba ANOVA de un factor se corroboró que no existen diferencias significativas en la cantidad de enzima entre las variantes ($p=0,68$).

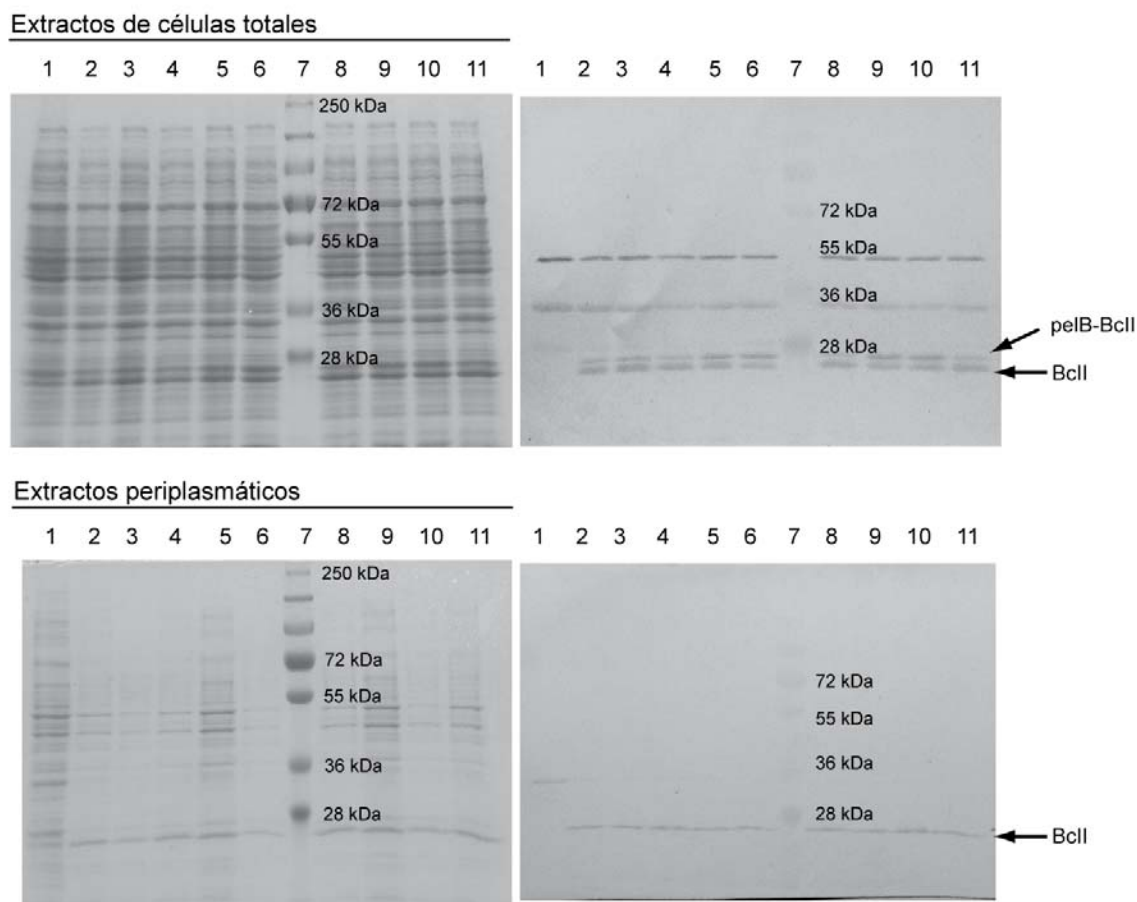


Figura 27: Niveles de expresión de BclI y las variantes en extractos de células totales y extractos periplasmáticos de células *E. coli*.

Se prepararon extractos de células totales y extractos periplasmáticos a partir de *E. coli* XL1-Blue transformada con el plásmido: 1) pKP, 2) pKP-wt BclI, 3) pKP-G, 4) pKP-GV, 5) pKP-GL, 6) pKP-GN, 8) pKP-GLV, 9) pKP-GLN, 10) pKP-GVN, 11) pKP-GLVN; e inducida con IPTG 0.5 mM. Las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE 12% (izquierda) y se revelaron por Western Blot (derecha). En los extractos totales se observan la formas pelB-BclI (péptido líder + proteína, de 27kDa) y la forma madura (25 kDa). Se observan algunas bandas inespecíficas, que también están presentes en el control negativo (pKP). El revelado de los ensayos de *Western Blot* se realizó mediante anticuerpos policlonales anti-BclI de conejo y anticuerpos anti-IgG de conejo de cabra conjugados a fosfatasa alcalina (BIO-RAD). MPM: Marcador de Peso Molecular, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Es posible que la tendencia observada en las actividades medidas con extractos periplasmáticos y su correlación con las CIMs se deba a que estas medidas reflejan diferencias en la proporción de proteína activa entre las variantes. Nos propusimos entonces explorar las propiedades proteicas involucradas en determinar la cantidad de proteína activa en el periplasma: la estabilidad de la proteína y la afinidad por su cofactor esencial, el ión Zn(II).

5.2.3 Medidas de estabilidad en extractos periplasmáticos y con preparaciones de proteína pura.

Como se explicó en la sección 5.1, se han descrito varios ejemplos en los cuales las interacciones epistáticas están mediadas por la estabilidad. En algunos casos, esto se ha demostrado mediante determinaciones de estabilidad de las enzimas purificadas en condiciones que permiten estimar parámetros termodinámicos, es decir, a partir de curvas de desnaturalización en condiciones reversibles [37,130]. Sin embargo, cuando esto no es posible, se compara el punto medio de la transición, siendo uno de los parámetros más empleados la temperatura media de la transición (T_M) [44,120,124].

En otros casos, con variantes de la β -lactamasa TEM, se ha visto que la estabilidad termodinámica no se correlaciona con la compensación observada a nivel aptitud de ciertas mutaciones [131] o que los valores de T_M por sí solos no son suficientes para explicar los fenómenos observados [44]. La introducción de otro tipo de ensayos mostraron que los efectos estabilizadores también pueden darse sobre la tendencia a formar agregados en el periplasma y/o a sufrir proteólisis [131]. Estos fenómenos pueden ser independientes de la estabilidad termodinámica y, en cambio, están relacionados con la estabilidad cinética de la proteína [44]. En nuestro caso, vimos que las condiciones del medio natural de la proteína pueden dar lugar a diferencias en las actividades que no se ven reflejadas en el estudio de actividad con las proteínas purificadas.

Por estas razones, decidimos analizar la estabilidad de las MBLs utilizando también extractos periplasmáticos, mediante evaluación de la actividad remanente ante la perturbación por temperatura. Se incubaron alícuotas de los extractos a temperaturas crecientes y se midió luego la actividad a 30°C. Para las variantes se midió la actividad contra cefalexina y para la enzima silvestre contra cefotaxima. Algunas curvas de las variantes se repitieron también con cefotaxima, observándose que no existen diferencias al cambiar el sustrato empleado. El proceso de inactivación por temperatura fue irreversible en todos los casos. Las gráficas de actividad remanente *versus* temperatura de incubación dieron lugar a curvas sigmoideas (Figura 28) de las cuáles se extrajo un parámetro de temperatura de transición aparente (T_{Ma}). Los valores obtenidos para cada variante se muestran en la Tabla 8.

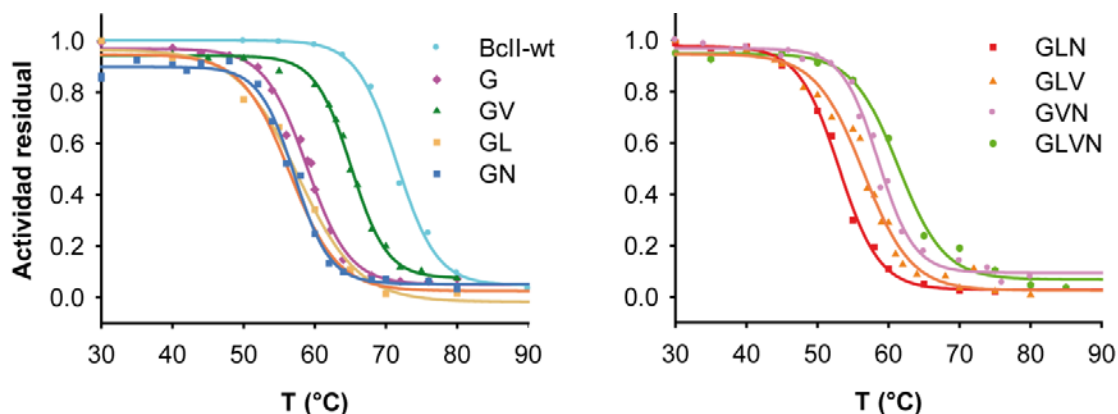


Figura 28: Curvas de termoestabilidad realizadas con extractos periplasmáticos.

Se incubaron alícuotas de los extractos periplasmáticos correspondientes a BclI-wt y a cada variante durante 5 minutos a temperaturas crecientes y luego se midió la actividad remanente a 30°C. Las medidas se realizaron con cefalexina para las variantes y con cefotaxima para BclI-wt.

Tabla 8: Valores de T_{Ma} obtenidos a partir de las curvas de termoestabilidad realizadas con extractos periplasmáticos.

Enzima	T_{Ma} (°C)
BclI-wt	$70,7 \pm 0,5$
G	$60,8 \pm 0,6$
GV	$65,7 \pm 0,4$
GL	$58,7 \pm 1,5$
GN	$60,0 \pm 1,6$
GVL	$57,8 \pm 1,1$
GLN	$54,1 \pm 0,9$
GVN	$61,5 \pm 1,0$
GLVN	$61,5 \pm 1,3$

Los valores de T_{Ma} se obtuvieron mediante el ajuste de los datos a curvas sigmoideas de 4 parámetros. Los valores mostrados son el promedio de tres curvas realizadas con extractos periplasmáticos independientes \pm el error estándar.

La mutación G262S produce una disminución de 10°C en la T_{Ma} respecto a la enzima silvestre, por lo cual es una mutación desestabilizadora. La adición de las mutaciones N70S y L250S no produce ningún cambio considerable en la T_{Ma} en el contexto de G262S. La mutación V112A produce un incremento de 5 °C en la T_{Ma} en el contexto de G262S. La variante resultante GV, es incluso la más estable de todas. Por otro lado, la variante menos estable es la triple mutante GLN. Al adicionarse la mutación V112A sobre esta triple mutante para dar lugar a la cuádruple mutante GLVN, también se produce un incremento en la T_{Ma} , en este caso de 6°C. Es decir, que en los

contextos G y GLN la mutación V112A actúa como compensatoria restaurando estabilidad. En paralelo, también actúa en estos contextos dando lugar a incrementos en las CIMs.

Para comparar los resultados obtenidos con medidas análogas en enzimas purificadas se realizaron los mismos ensayos, utilizando en la incubación una concentración equivalente a la de la enzima en los extractos periplasmáticos (ver sección 2.13.2.1). Sin embargo, no pudieron obtenerse medidas confiables dado que a partir de 30°C se producía una inactivación considerable de la enzima (más del 60%). Esto nos da un indicio de que existen diferencias entre los procesos que se pueden poner de manifiesto en uno u otro medio. Luego de probar distintas condiciones, encontramos que incubando la enzima a concentraciones de 5-10 μ M y diluyendo luego para la medida, podían obtenerse curvas sigmoideas (Figura 29). Sin embargo, los resultados fueron diferentes a los obtenidos con las preparaciones de periplasma, se observó cierta reversibilidad del proceso y un corrimiento de las T_{Ma} hacia valores más altos que los observados con extractos periplasmáticos (Figura 30).

En paralelo, también se midieron con estas muestras los espectros de dicroísmo circular en la región del UV-lejano y se graficó la señal remanente a 220 nm vs temperatura de incubación (Figura 29), obteniendo valores de T_{Ma} muy similares con ambos métodos (Figura 30).

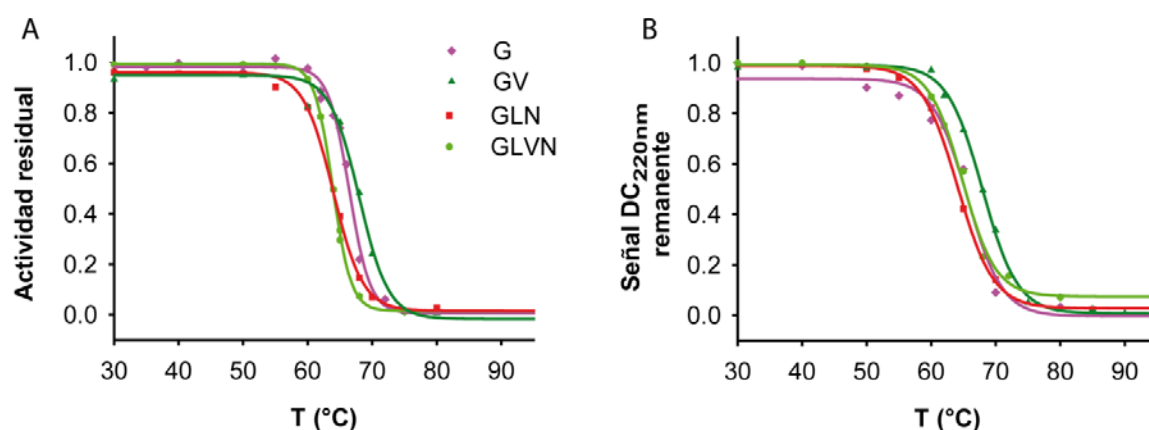


Figura 29: Curvas de termoestabilidad realizadas con enzimas purificadas.

A) Se incubaron alícuotas de proteína a una concentración de entre 5-10 μ M a temperaturas crecientes, luego se realizó una dilución a concentración final 0,3 μ M en solución amortiguadora a 4°C y a partir de dicha dilución se tomaron alícuotas para las medidas de actividad remanente a 30°C. B) Con las muestras a concentración 5-10 μ M se realizaron espectros de dicroísmo circular en la región 200-250 nm y se tomó la señal a 220 nm para graficar versus la temperatura de incubación. En todos los casos la solución amortiguadora empleada fue Hepes 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5.

Si comparamos los valores de T_{Ma} obtenidos con extractos periplasmáticos para las variantes G, GV, GLN y GLVN con los obtenidos con enzimas puras, se observa que el efecto estabilizador de V112A sólo se pone de manifiesto claramente en los experimentos realizados con las preparaciones de periplasma (Figura 30). Sin embargo, si bien con las enzimas puras no se observa prácticamente el efecto estabilizador de V112A sobre la variante GLN mediante estas metodologías, sí se observó en la solubilidad de la proteína luego de la sobreexpresión a 37°C: la variante GNL se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble luego de sonicar las células; mientras que GLVN se encontraba en la fracción soluble. Es decir, que comprobamos que según la metodología empleada pueden manifestarse efectos en la estabilidad que responden a procesos diferentes.

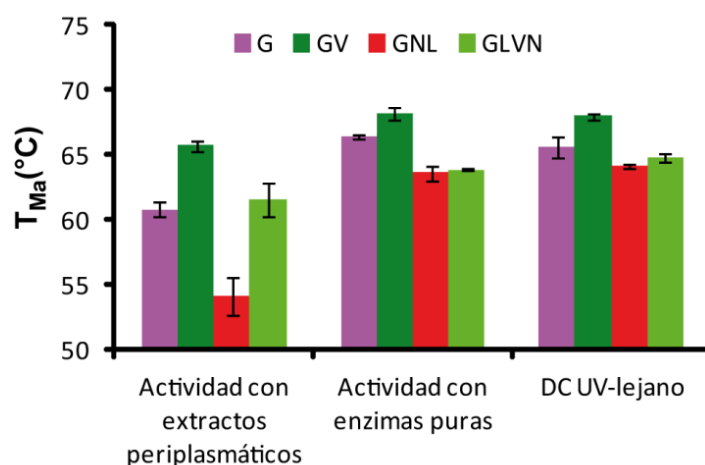


Figura 30: Comparación de los valores de temperatura de transición obtenidos mediante distintos métodos.

Valores de T_{Ma} obtenidos mediante desnaturalización térmica, monitoreando el estado de plegamiento por actividad en extractos periplasmáticos o con enzimas purificadas y por la señal de dicroísmo circular a 220 nm. La diferencia en los valores de T_M entre las variantes G y GV y las variantes GNL y GLVN sólo se evidencia en forma significativa en el caso de las determinaciones realizadas con extractos periplasmáticos.

5.2.4 Efecto de la disponibilidad de Zn(II) en la capacidad de conferir resistencia de BclI y sus variantes optimizadas y su relación con la afinidad por Zn(II) de dichas enzimas.

La resistencia a antibióticos β -lactámicos mediada por enzimas MBLs requiere estrictamente de la unión del cofactor Zn(II). Se ha demostrado en *E. coli* que el transporte de las MBLs desde el citoplasma hacia el periplasma depende del sistema de secreción Sec [135]. Esto implica que la exportación tiene lugar con el polipéptido desplegado y que la forma nativa, con los

iones Zn(II) coordinados al sitio activo, debe ensamblarse en el periplasma. De hecho, se ha visto que la sobreexpresión en citoplasma de estas enzimas puede dar lugar a la unión artefactual de otros iones metálicos divalentes, como Fe(II) o Mn(II), en los sitios de coordinación del Zn(II) [136,137]. Esto indica que el compartimiento celular en el que se ensambla la proteína determina la composición metálica. Este fenómeno también se ha observado en las metaloproteínas de la familia de las cupinas, las cuales pueden unir Mn(II) o Zn(II) según se plieguen en el citoplasma o en el periplasma, respectivamente [138].

Por otro lado, también se ha visto en las MBL que la composición metálica del medio de cultivo puede determinar las proporciones de proteína con distintos metales divalentes unidos [137]. Como se describió en el Capítulo 3, experimentos realizados en el laboratorio con la mutante de BcII-C221D mostraron que su baja afinidad por Zn(II) provoca un fenotipo de resistencia altamente dependiente del contenido de Zn(II) en el medio de cultivo. Es decir, que mediante ensayos de resistencia en condiciones variables de Zn(II) pueden inferirse el impacto de las mutaciones sobre la afinidad por dicho metal. Nos planteamos entonces probar el impacto de la mutación G262S y de L250S, V112A y N70S en el contexto G262S, mediante este tipo de ensayos.

Se realizaron medidas de CIM para cefalexina en distintas condiciones de disponibilidad de Zn(II). Para ello, al medio de cultivo LB (en el cual la concentración de Zn(II) es de aproximadamente 5 μ M [106]) se agregó el quelante EDTA (5 μ M) para crear condiciones de Zn(II) en defecto; ó ZnSO₄ (500 μ M) para dar lugar a condiciones de Zn(II) en exceso. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Puede observarse que los valores de CIM para las células que expresan BcII-wt son sensibles a la concentración de Zn(II) en el medio. Sin embargo, ante la adición de G262S, dicha sensibilidad se incrementa. La variante G pasa de tener una CIM de 32 μ g/ml en presencia de EDTA, a una CIM de 128 μ g/ml en medio LB no suplementado y alcanzar una CIM de 512 μ g/ml en exceso de Zn(II). Es decir, que la variante G tiene el potencial de conferir altos valores de resistencia, pero dicho potencial se encuentra condicionado a la disponibilidad de Zn(II).

Tabla 9: Valores de CIMs para cefalexina ($\mu\text{g/ml}$) para células de *E.coli* expresando BcII-wt o las variantes a concentraciones de Zn(II) variable.

XL1-Blue <i>E. coli</i> + pKP-	LB + EDTA 5 μM	LB	LB + ZnSO ₄ 500 μM
-	16	16	16
BcII-wt	16	32	64
G	32	128	512
GL	64	256	1024
GV	256	256	1024
GN	256	256	1024
GLN	512	512	1024
GLV	512	512	1024
GVN	512	512	1024
GLVN	1024	1024	1024

Las dobles mutantes GL, GV y GN presentan una aumento de la CIM desde 256 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ al pasar del medio no suplementado al medio con exceso de Zn(II). La CIM en los casos de GV y GN no se ven afectadas por el agregado de EDTA; mientras que sí disminuye para GL, si bien en este caso la CIM sigue siendo mayor que la de la variante G. Las triples mutantes GLN, GLV y GVN presentan un aumento de la CIM desde 512 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ al pasar del medio no suplementado al medio con exceso de Zn(II) y no se ven afectadas por el agregado de EDTA. Finalmente, la cuádruple mutante GLVN es la única capaz de conferir una MIC de 1024 $\mu\text{g/ml}$ en el medio no suplementado.

Estos resultados demuestran que la disponibilidad de Zn(II) afecta mayormente a la variante G y que la dependencia de la CIM respecto a la disponibilidad de Zn(II) disminuye al adicionarse las demás mutaciones: L250S, V112A y N70S. Como se mencionó previamente, en base a los expuesto en el Capítulo 3 con la mutante C221D, los fenotipos de resistencia dependientes de Zn(II) pueden relacionarse con cambios en la afinidad por Zn(II) de la enzima. En el caso de la mutación G262S, podría inferirse que disminuye la afinidad por Zn(II); mientras que las sustituciones L250S, V112A y N70S revierten este efecto, dando lugar a una recuperación de la afinidad. Para corroborar esta hipótesis, se midieron las afinidades por Zn(II) de las enzimas

mediante los ensayos de competición con el quelante colorimétrico PAR, descritos en el Capítulo 3. Por simplicidad, se optó por evaluar las variantes de un sólo camino: G->GN->GVN->GLVN. Se priorizó dicho camino, dado que incluye la variante GN, y por lo tanto, puede evaluarse la interacción de epistasis de signo presente entre las mutaciones G262S y N70S (la epistasis positiva observada en el par G262S-V112A puede atribuirse a un impacto sobre la estabilidad proteica, según se describió en la sección 5.2.3, mientras que no hay interacción en el par G262S-L250S).

Las curvas obtenidas en los ensayos de competición y los ajustes realizados con el programa Dynafit se muestran en la Figura 31. Los valores de K_d obtenidos para los dos eventos de unión se muestran en la Tabla 10. Los valores de K_{d1} , es decir, correspondientes al primer evento de unión, se encuentran en el orden nanomolar bajo, no pudiendo ser determinados con precisión en la mayoría de los casos. La mutación G262S disminuye la afinidad por la unión del segundo equivalente de Zn(II) dado que la K_{d2} aumenta de $(8,6 \pm 3,9)$ nM a (178 ± 54) nM. La adición de la mutación N70S en el contexto de G262S restablece la afinidad, dado que se produce una disminución de la K_{d2} a un valor más cercano al de la enzima silvestre, $(22,9 \pm 5,0)$ nM. Ante la adición de las mutaciones V112A y L250S se observan variaciones menores. La K_{d2} se mantiene en valores bajos para las variantes GVN y GLVN, siendo estos valores óptimos para la captación de Zn(II) en condiciones limitantes, según se refleja en los valores de CIM.

Tabla 10: Constantes de disociación para el primer y segundo evento de unión de Zn(II) para BcII-wt y las variantes estimadas mediante ensayos de competición con el compuesto PAR.

	K_{d1} (nM)	K_{d2} (nM)
BcII-wt	$1,9 \pm 3,3^{\#}$	$8,6 \pm 3,9$
G	$4,4 \pm 1,3$	178 ± 54
GN	$0,3 \pm 0,4^{\#}$	$22,9 \pm 5,0$
GVN	$1,9 \pm 1,2^{\#}$	$10,2 \pm 2,1$
GLVN	$1,3 \pm 0,8^{\#}$	$25,9 \pm 4,9$

Los datos mostrados corresponden a los valores de mejor ajuste para cada parámetro \pm el error estándar según se estimó con el programa Dynafit [85].

[#]En estos casos K_{d1} no se pudo estimar con precisión.

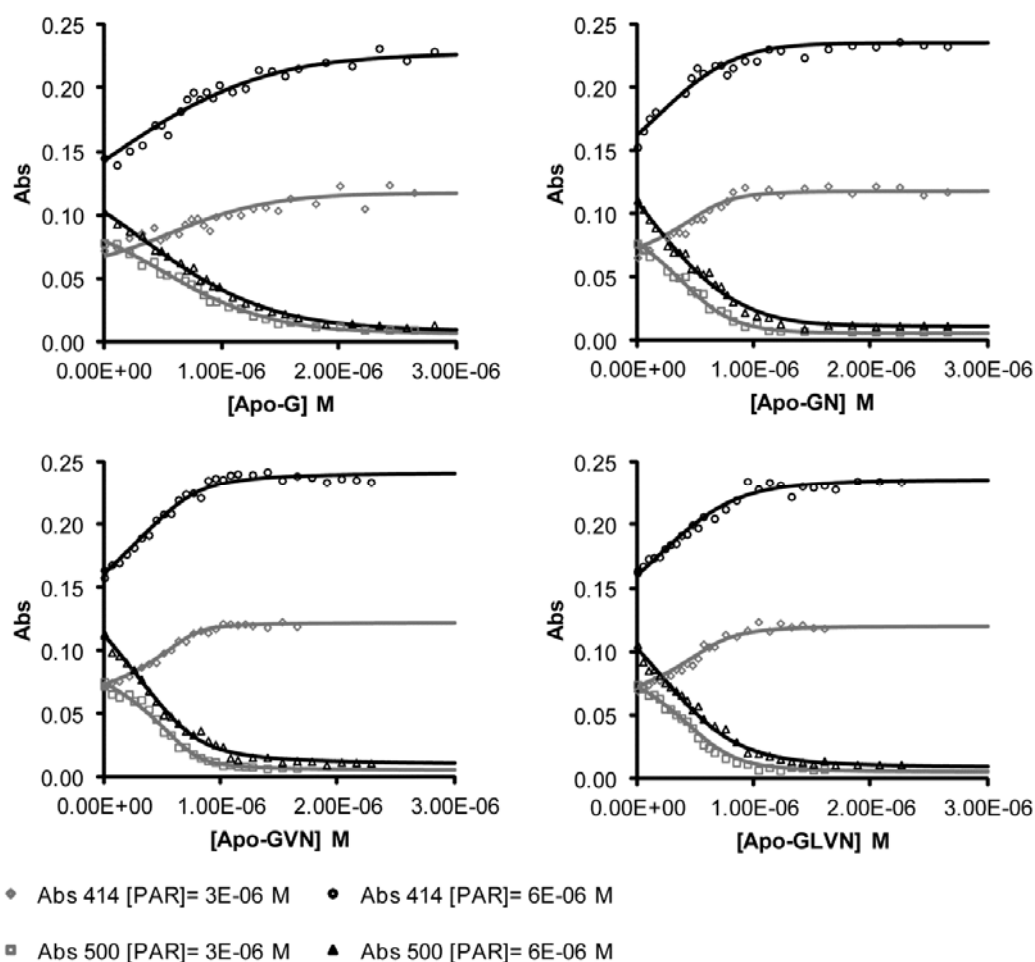


Figura 31: Ensayos de competición con PAR para la determinación de la afinidad por Zn(II) de las enzimas BclI-wt y las variantes G, GN, GVN y GLVN.

Se agregaron concentraciones crecientes de apo-proteína a una solución de $[Zn(II)] = 1,5 \mu M$ y $[PAR] = 6 \mu M$ ó $[PAR] = 3 \mu M$. El incremento en absorbancia a 414 nm refleja la liberación del PAR y la disminución en absorbancia a 500 nm refleja la desaparición del complejo $(PAR)_2Zn$. Las medidas se realizaron en solución amortiguadora MOPS 40 mM; NaCl 100 mM; pH 7,3; previamente tratada con CHELEX-100, a 25°C. Cada punto representa el promedio de 3 replicas. Los ajustes se realizaron con el programa Dynafit según el modelo descrito en el texto.

Podemos concluir que G262S produce una disminución en la afinidad por Zn(II) por lo cual presenta una alta dependencia de su capacidad de conferir resistencia con las condiciones de disponibilidad de Zn(II) en el medio. La mutación N70S actúa como compensatoria en el contexto de G262S restaurando la afinidad por el Zn(II) a niveles adecuados para competir en condiciones restrictivas. Esto explica la interacción epistática del par G262S-N70S y pone en evidencia el rol clave que cumple la optimización de la unión de Zn(II) en la evolución de las MBLs.

5.2.5 Contribución de las propiedades proteicas analizadas en la capacidad de conferir de resistencia para distintos antibióticos β -lactámicos

Hasta el momento nos focalizamos en el efecto de las mutaciones sobre la capacidad de conferir resistencia de BclI frente el antibiótico cefalexina, dado que fue el empleado en el proceso de Evolución Molecular Dirigida. Sin embargo, las MBLs son enzimas promiscuas, y naturalmente están expuestas en simultáneo a la presión de selección ejercida por distintos sustratos β -lactámicos. Como se describió en la sección 5.2.1, la mutación G262S no reduce la actividad de la enzima frente a otros sustratos β -lactámicos, por el contrario, la actividad se ve aumentada en algunos casos y esto se mantiene con las demás sustituciones.

Dado que la estabilidad y la afinidad por Zn(II) afectan en forma global a la fracción de proteína activa en el periplasma, se esperaría que los efectos observados fuesen similares para distintos sustratos. De no ser así, estaríamos ante una particularidad del sustrato cefalexina. Se decidió poner a prueba esta cuestión con otras dos cefalosporinas: cefotaxima y ceftazidima (Figura 32).

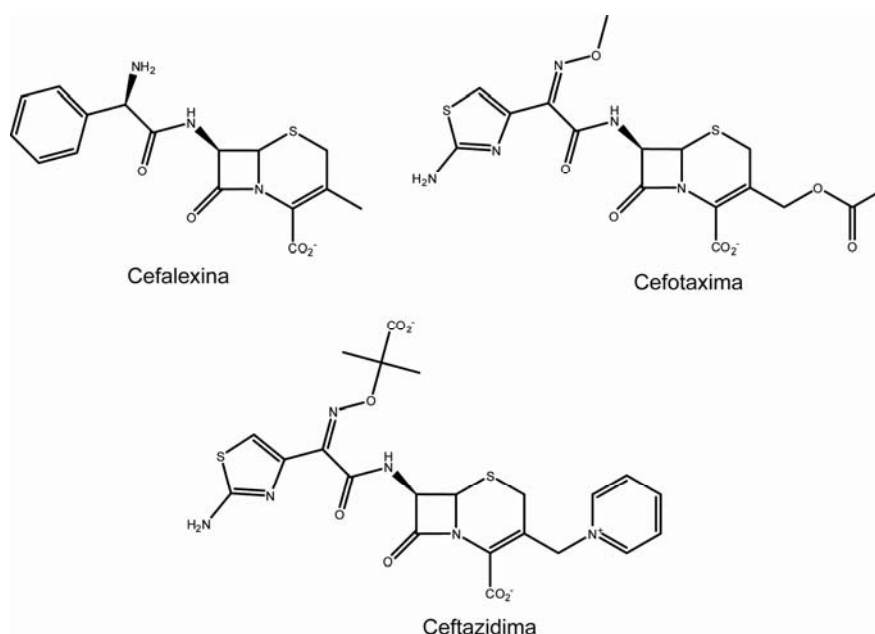


Figura 32. Estructura química de las cefalosporinas cefalexina, cefotaxima y ceftazidima.

Mientras que la cefalexina es una cefalosporina de primera generación, cefotaxima [139] y ceftazidima [140] son de tercera generación y, por lo tanto, de mayor espectro de acción. Ceftazidima se reserva en la clínica para casos de infecciones graves provocadas por *P. aeruginosa*.

El antibiótico cefotaxima es hidrolizado por la enzima silvestre con un k_{cat}/K_M en el orden de $10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, y su actividad aumenta con la mutación G262S alrededor de 4 veces (Tabla 6). Ceftazidima, en cambio, es un antibiótico pobremente hidrolizado por la enzima silvestre, con un k_{cat}/K_M en el orden de $10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y cuya actividad puede aumentar entre 6-20 veces con las distintas variantes que contienen la mutación G262S, pasando a un orden de k_{cat}/K_M de $10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Tabla 6). En la Tabla 11 se muestran los valores de CIMs para estos dos antibióticos en medio LB no suplementado y en medio LB suplementado con Zn(II).

Tabla 11: Valores de CIMs para ceftazidima y cefotaxima ($\mu\text{g/ml}$) conferidos a *E.coli* por las enzimas BclI y sus variantes en medio con y sin Zn(II) en exceso.

<i>E. coli</i> XL1-Blue + pKP-	Ceftazidima		Cefotaxima	
	LB	LB + ZnSO ₄ 500 μM	LB	LB + ZnSO ₄ 500 μM
-	0,125	0,125	0,03	0,03
wt BclI	16	32	16	32
G	16	64	2	64
GL	64	128	8	64
GV	64	128	8	64
GN	64	128	8	64
GLN	128	>128	16	>64
GLV	128	>128	16	>64
GVN	128	>128	16	>64
GLVN	128	>128	16	>64

En el caso de ceftazidima, la mutación G262S no produce cambios en la CIM respecto a la enzima silvestre en el medio no suplementado, mientras que sí da lugar a un aumento en la resistencia en el medio suplementado con Zn(II). Al agregarse las demás sustituciones, se producen aumentos en las CIMs, tanto en ausencia como en presencia de exceso de Zn(II).

Para cefotaxima, en el medio no suplementado con Zn(II), la mutación G262S es deletérea. Esto sugiere que los efectos negativos de esta mutación sobre la estabilidad y la afinidad por Zn(II) tienen más peso en este caso sobre la aptitud que el aumento en la eficiencia hidrolítica. La

resistencia se recupera ante el agregado de exceso de Zn(II), con valores que superan incluso a la enzima silvestre. La adición de las demás sustituciones restablece también la resistencia en el medio no suplementado, lo cual confirma su rol como compensatorias, al menos en estabilidad y afinidad por Zn(II) para el caso de V112A y N70S respectivamente. De todas maneras, no se supera a la enzima silvestre. En el medio suplementado con Zn(II), todas las variantes superan a la enzima silvestre.

En general, vemos que se conserva la misma tendencia observada con cefalexina: la mutante G presenta un perfil de resistencia altamente dependiente de Zn(II); mientras que el agregado de las demás sustituciones en el contexto de G262S permite incrementar la CIMs en medio no suplementado.

5.3 Discusión

5.3.1 Contribución de la actividad enzimática a la aptitud y efectos adicionales revelados por las medidas en periplasma

Uno de los mayores desafíos en el estudio de evolución de proteínas es el intento de correlacionar los aspectos moleculares afectados por las mutaciones con la aptitud observada a nivel del organismo (en nuestro caso la resistencia a antibióticos β -lactámicos). Los aspectos moleculares son usualmente estudiados en las proteínas purificadas, lo cual en general es útil para detectar los efectos de las mutaciones cuando estos son muy drásticos. En la sección 5.2.1 se observa claramente cómo las medidas *in vitro* pueden dar cuenta del marcado efecto de la mutación G262S en el aumento de la eficiencia hidrolítica, pero no se evidencian efectos ante el agregado de las mutaciones L250S, V112A y N70S a pesar de que estas aumentan la resistencia en el contexto de G262S. En cambio, en la sección 5.2.2 vemos cómo las medidas de actividad en periplasma muestran una buena correlación con las medidas de CIMs para cada variante.

Las distintas enzimas recombinantes se obtuvieron mediante sobreexpresión en el citoplasma de *E.coli*, en condiciones optimizadas, a baja temperatura y exceso de Zn(II) en el medio de cultivo. Las medidas de actividad se realizaron en exceso de Zn(II), siguiendo el protocolo de rutina utilizado para el estudio de las MBLs. De hecho, se intentaron hacer medidas sin exceso de Zn(II), pero esto resultaba en una inactivación de la enzima durante el curso de reacción que imposibilitó obtener parámetros cinéticos. En contraste, los extractos periplasmáticos contienen a la enzima expresada de la misma manera que durante los ensayos de CIMs. Si bien el medio

periplasmático está diluido en el extracto y se diluye aún más en la medida de actividad, la enzima no se encuentra aislada de los demás componentes de dicho medio. En este caso, las medidas de actividad pudieron realizarse sin el agregado de un exceso de Zn(II) al medio.

Todas estas diferencias pueden ser responsables de los diferentes patrones de actividad en cada caso. En los extractos periplasmáticos, además de observarse el efecto beneficioso de G262S sobre la actividad de la enzima para cefalexina, también se evidencia el efecto de las demás sustituciones en producir leves aumentos en la actividad en forma concomitante con los aumentos en CIMs observados. Por ello, nos propusimos averiguar si los mismos se correlacionan con aumentos en la fracción de proteína activa, la cual está determinada principalmente por la estabilidad de la proteína y por la capacidad de captar Zn(II) para formar la especie activa, es decir, con dos iones Zn(II).

5.3.2 Contribución de la estabilidad a la capacidad de conferir resistencia de las MBLs

La contribución de la estabilidad de las proteínas a la aptitud se ha puesto de manifiesto con distintos ejemplos y metodologías. Se ha observado que mutaciones beneficiosas para la función de una proteína que a su vez producen una fuerte desestabilización de su estructura, requieren de otras mutaciones que restauren la estabilidad (compensatorias) para poder fijarse en la evolución. En nuestro caso, observamos que la ganancia de función sustentada por la mutación G262S tiene un costo, que es una reducción de la estabilidad proteica. La mutación V112A actúa como una mutación compensatoria restaurando la estabilidad en diferentes contextos genéticos.

El rol encontrado para la mutación V112A explica la relación epistática con la mutación G262S (sección 4.2.1) y su presencia ubicua en los clones seleccionados a altas concentraciones de cefalexina (sección 4.2.2). Previamente en el laboratorio se resolvió la estructura cristalográfica de la mutante GLVN [134]. En la Figura 33 se muestra un análisis del cambio que produce la mutación V112A. En la estructura de BclI, las cadenas laterales de los residuos L82, V112, I114 y L128 forman un carozo hidrofóbico compacto. En la estructura de GLVN, al producirse el cambio V112A, queda más espacio disponible y se forma una pequeña cavidad.

En este carozo hidrofóbico participan residuos conservados en las MBLs (Figura 34). Cabe destacar que, dada la baja homología de secuencia entre las MBLs en general (las MBLs de subclase B1 comparten alrededor del 23% de identidad de secuencia de aminoácidos, y entre subclases la homología no supera el 20% [47]), las regiones conservadas son indicativas de

residuos clave para la funcionalidad de la enzima. Esto sugiere que el experimento de Evolución Molecular Dirigida nos habría indicado una región que es importante para el plegamiento y la estabilidad en las MBLs.

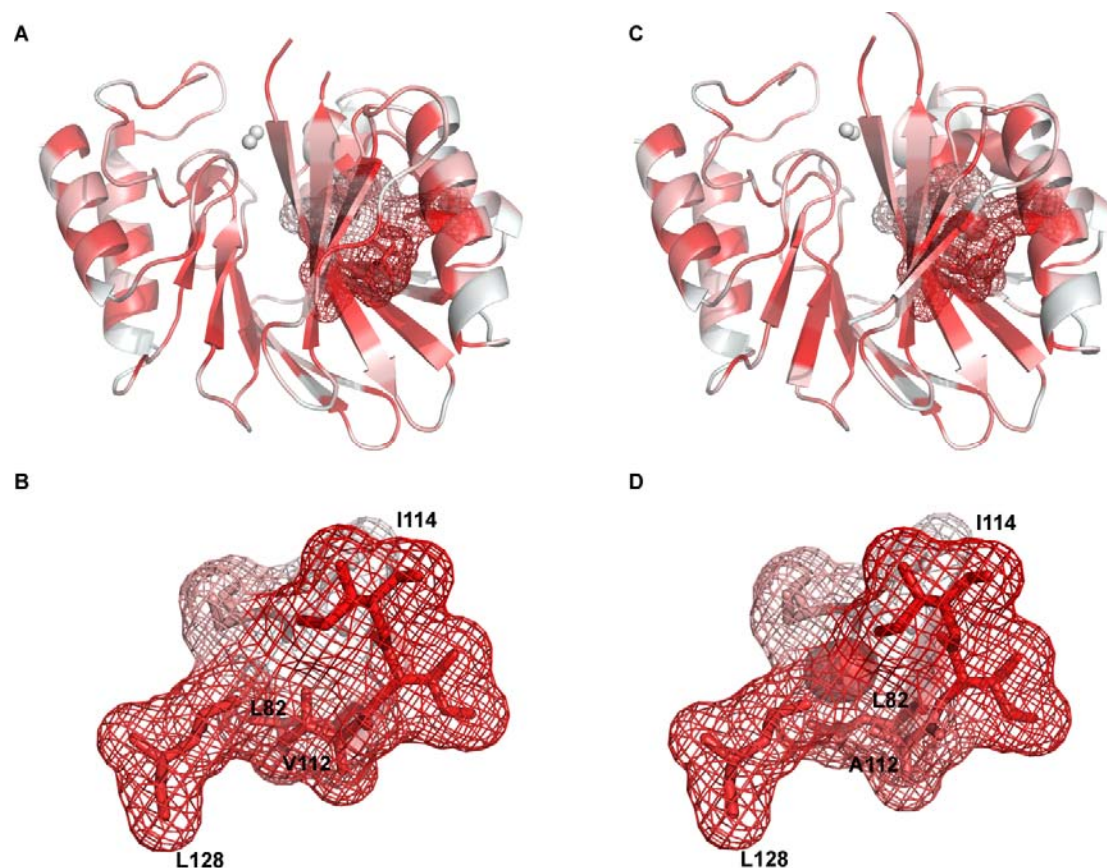


Figura 33: Representación del carozo hidrofóbico del residuo en la posición 112 en las estructuras de BclI y de GLVN.

En los paneles superiores se muestran las estructuras de A) BclI (PDB 1BC2) y C) GLVN (PDB 3FCZ) coloreadas en una escala de blanco a rojo que aumenta con la hidrofobicidad de los residuos (escala consenso normalizada de hidrofobicidad [141,142]). Los residuos implicados en el carozo hidrofóbico se muestran en bastones y su superficie como malla. Los iones Zn(II) se muestran como esferas grises. En los paneles B) BclI y D) GLVN se muestra ampliado y desde otro ángulo el carozo hidrofóbico, se indican los residuos que participan mediante sus cadenas laterales. En el panel D) se indica la cavidad que se forma por la sustitución V112A como superficie rellena. La cavidad se detectó usando el programa Pymol con un límite inferior para la detección de 2,8 Å (correspondiente a 2 veces el radio de la molécula de solvente).

	...	82	83	84	...	112	113	114	...	128	...
B1											
BclI		L	V	D		V	I	I		L	
VIM-2		L	I	D		A	V	S		L	
IMP-1		L	I	D		S	I	S		L	
NDM-1		V	I	D		A	V	V		L	
SPM-1		I	V	S		A	I	N		Y	
B2											
CphA		L	V	G		I	L	L		L	
B3											
L1		V	L	D		V	I	N		W	

Figura 34: Residuos conservados en las MBLs de subclase que participan en el carozo hidrofóbico del residuo en la posición 112.

Se muestran las regiones conservadas que incluyen los residuos que participan en el carozo, en color se resaltan aquellos que orientan sus cadenas laterales hacia dicho carozo. La intensidad del color indica la conservación de residuos hidrofóbicos en cada posición.

La mayoría de los estudios realizados con el fin de determinar el rol de la estabilidad proteica en la evolución se basan en estudios de la estabilidad termodinámica de las proteínas *in vitro*. Sin embargo, la estabilidad termodinámica por sí misma no garantiza que la proteína se mantenga en su forma nativa durante un tiempo relevante *in vivo*, dado que las alteraciones irreversibles pueden despoblar el estado nativo [143]. La estabilidad cinética, en cambio, está relacionada con la desnaturalización irreversible y es más apropiada para describir el comportamiento de las proteínas en el medio celular, el cual es dinámico y presenta altas concentraciones de proteínas y otros componentes [143]. Estudios recientes han demostrado que las interacciones inespecíficas leves en el citoplasma bacteriano pueden tener un efecto desestabilizador; en contraste con la visión de que la alta concentración de moléculas en el medio celular favorecería los estados compactos [144]. Esto refuerza la necesidad de implementar metodologías que permitan monitorear la estabilidad proteica en condiciones comparables a las del ambiente celular.

En el presente trabajo mostramos un ejemplo donde una mutación estabilizadora no contribuye de manera sustancial a la estabilidad *in vitro* de la proteína, sino que su efecto se pone de manifiesto trabajando en extractos periplasmáticos. En los experimentos de termoestabilidad realizados con extractos periplasmáticos, la pérdida de actividad por temperatura fue irreversible en todos los casos, por lo que el proceso de inactivación observado está gobernado por

fenómenos cinéticos. Además, en este contexto la proteína se encuentra en presencia de los demás componentes periplasmáticos.

Nuestros resultados indican que monitorear el rol de la estabilidad proteica en la aptitud a nivel organismo requiere de metodologías complementarias donde puedan ponerse de manifiesto los distintos procesos que engloban dicha propiedad.

5.3.3 Optimización de la unión de Zn(II) en la evolución de las MBLs

La unión de Zn(II) es esencial para la activación de las MBLs. Como se describió en el Capítulo 3, las condiciones impuestas por el medio ambiente pueden limitar la captación de Zn(II), por lo cual las MBLs de clase B1 requieren de sitios de alta afinidad para formar la especie di-Zn(II). Al poner a prueba el impacto de la disponibilidad de Zn(II) en los valores de CIM, observamos que la adición de la mutación G262S da lugar a un fenotipo de resistencia altamente dependiente de la disponibilidad de Zn(II). Esta dependencia desaparece a medida que se agregan las demás sustituciones. Al determinar las constantes de disociación para las proteínas involucradas en el camino wt→G→GN→GVN→GLVN se observa que la mutación G262S produce una disminución en la afinidad del segundo evento de unión de Zn(II); mientras la mutación N70S *a posteriori* revierte este efecto. Es decir que la mutación N70S cumple un rol compensatorio, restaurando la afinidad a un nivel similar al de la enzima silvestre. Esto se ve reflejado en un aumento en la capacidad de conferir resistencia en condiciones de Zn(II) restrictivas de la doble mutante GN respecto a la mutante simple G y explica la relación epistática encontrada entre las mutaciones G262S y N70S.

Podemos concluir que la unión de Zn(II) es una característica que puede ajustarse durante la evolución de las MBL. En el Capítulo 3 vimos cómo un residuo ligando del Zn(II) puede modular la afinidad. En cambio, en el caso de G262S y N70S, corresponden a mutaciones en residuos de la segunda esfera de coordinación que, indirectamente, también afectan la coordinación del Zn(II). En base a dicha estructura cristalográfica de la mutante GLVN [134] pueden inferirse los efectos que ejercen las mutaciones G262S y N70S relacionados con la afinidad por el ión Zn(II). En primer lugar, cabe destacar que existen muy pocas variaciones entre la estructura de BcII-wt (PDB 1BC2) y GLVN (PDB 1FCZ), como puede observarse en la Figura 35.

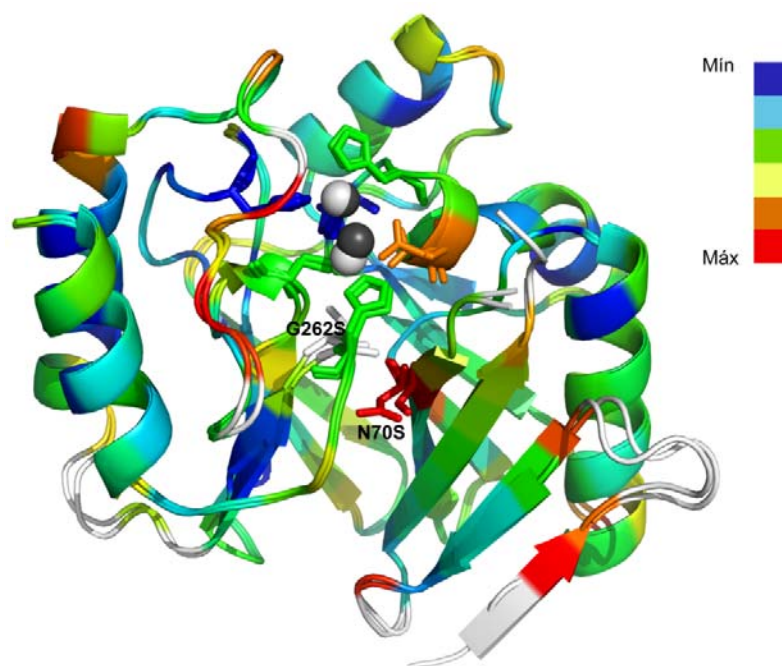


Figura 35: Comparación de las estructuras de BclI-wt y la mutante cuádruple GLVN.

Se muestran superpuestas las estructuras de BclI-wt (PDB 1BC2) y GLVN (PDB 3FCZ), indicando con una escala de colores los valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) para los carbonos α . La escala se construyó entre el valor mínimo de RMSD encontrado: 0,05 Å (azul) y el máximo: 0,8 Å (rojo). En blanco se muestran las regiones que no pudieron ser alineadas por presentar una variación mayor a la aceptable por el método. El alineamiento y cálculo de RMSD se realizó con el programa PyMol (DeLano Scientific LLC).

A pesar de conservar la estructura global, en la mutante GLVN existen cambios notorios en el sitio Zn2. La posición del ión Zn(II) del sitio Zn2 está desplazada aproximadamente 1,25 Å comparada con la enzima silvestre. Dos de los residuos ligandos en el sitio Zn2 sufren cambios importantes en la distancia metal-ligando, como se muestra en la Tabla 12. La mutación de Gly por Ser en la posición 262 da lugar a una interacción entre el grupo OH-Ser262 y el residuo Cys221 (Figura 36). Esto podría provocar una disminución en la densidad electrónica sobre el átomo de azufre del residuo Cys221, lo cual explicaría la disminución de la distancia entre dicho ligando y el ión Zn(II), como se observa en la Tabla 12. Este efecto puede relacionarse claramente con la disminución de afinidad por el ión Zn(II) del sitio Zn2.

Tabla 12: Distancias metal-ligando (Å) correspondientes al sitio activo de las enzimas BcII-wt (PDB 1BC2) y la mutante GLVN (PDB 3FCZ).

	GLVN _A	GLVN _B	BcII-wt _A	BcII-wt _B	$\Delta(\text{GLVN} - \text{BcII-wt})$ Promedio
Zn1 - N@His116	2,31	2,17	2,27	2,24	-0,015
Zn1 - N@His118	1,82	1,86	1,95	2,16	-0,215
Zn1 - N@His196	1,87	2,1	2	2,11	-0,07
Zn2 - S@Cys221	2,56	2,33	1,91	1,99	0,495
Zn2 - Oδ2@Asp120	2,74	2,29	2,75	2,91	-0,315
Zn2 - Nδ@His263	2,96	2,15	2,59	2,45	0,035

Para cada proteína se indican los valores para las dos moléculas en la unidad asimétrica. La superposición de las estructuras cristalográficas y la medición de las distancias se realizaron empleando el programa *PyMol* (DeLano Scientific LLC). La última columna indica el promedio de las diferencias entre las distancias de las cuatro combinaciones posibles de unidades asimétricas.

Por otro lado, existen cambios en la disposición de enlaces por puente hidrógeno que conectan los bucles que conforman el sitio Zn2 (denominados L3, L7 y L12, ver Figura 36), que pueden relacionarse principalmente con la mutación N70S. Algunos de estos cambios están relacionados con el residuo Arg121. En la estructura de BcII-wt el grupo guanidinio del residuo de Arg121 forma puentes hidrógeno con el grupo carboxilo del residuo ligando del sitio Zn2 Asp120, el grupo oxidrilo del residuo Ser69, el oxígeno carbonílico del esqueleto peptídico del residuo Gly262 y el oxígeno carbonílico del esqueleto peptídico del residuo Asn70 (Figura 36 A). En la estructura de GLVN, el residuo Arg121 sufre una rotación de manera que queda a una distancia de 4 Å del grupo carboxilo del residuo Asp120 (Figura 36). Por lo tanto, ya no puede interactuar con dicho grupo; mientras que mantiene los enlaces por puente hidrógeno con el grupo oxidrilo del residuo Ser69 y el oxígeno carbonílico del esqueleto peptídico del residuo Ser70. En consecuencia, se esperaría que haya más carga negativa sobre los átomos de oxígeno del grupo carboxilo del ligando Asp120, lo que explicaría el acortamiento de la distancia metal-ligando (Tabla 12). Esto podría compensar el efecto de la mutación G262S sobre el ligando de Cys221 (Tabla 12).

En el laboratorio, durante el trabajo de Tesis del Lic. Mariano González, se realizaron experimentos de RMN para explorar la dinámica molecular en la escala de μs-ms correspondiente a las proteínas BcII-wt, G, N y GN. Resultados preliminares muestran que la mutación G262S produce un aumento en la movilidad de los bucles L7 y L10 (Figura 36). La mutación N70S, en el contexto de G262S, mantiene la movilidad de los bucles L7 y L10, y aumenta la movilidad de los bucles L3 y L12. Este último efecto puede comprenderse a partir del rearrreglo de enlaces por

puente hidrógeno que se observa en la Figura 36, dado que se pierde la conexión entre estos dos bucles. Se observó además que el residuo Arg121 aumenta su movilidad en la mutante G, pero el aumento es mucho mayor cuando se suma la mutación N70S. Puede deducirse que la flexibilización de los bucles L3 y L12 deja más libertad al residuo de Arg121 para adoptar otras conformaciones que alejan al grupo guanidinio del residuo de Asp120, permitiendo así que este se acerque al Zn(II).

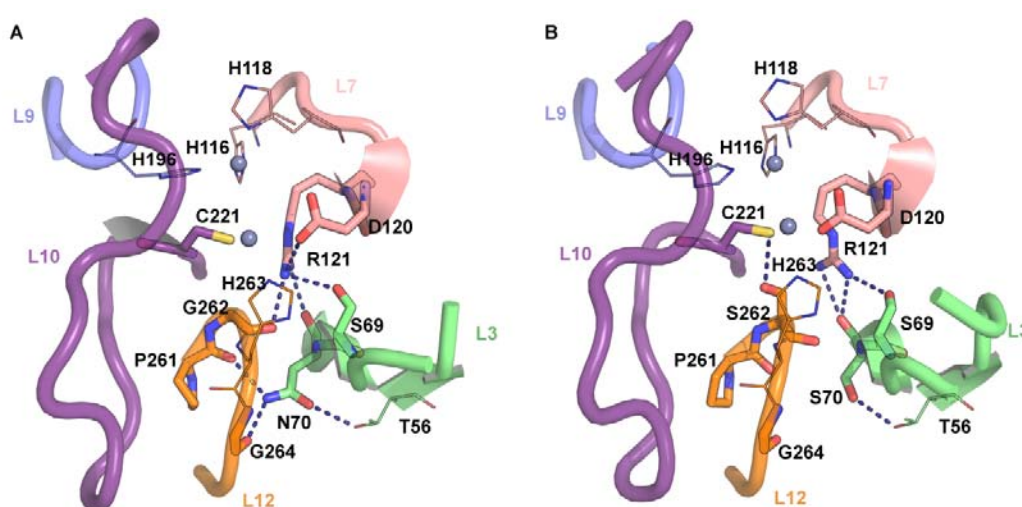


Figura 36: Cambios producidos por las mutaciones G262S y N70S en el sitio Zn2 de BclI.

Se muestran los sitios activos de A) BclI-wt (PDB 1BCII) y B) GLVN (PDB 3FCZ). Los bucles L3 y L10 flanquean el sitio activo y L7, L9, L10 y L12 contienen ligandos de los iones Zn(II). Los iones Zn(II) se muestran como esferas grises, se muestran los residuos ligandos, los residuos implicados en las mutaciones G262S y N70S, y aquellos implicados en enlaces por puente hidrógeno. Se muestran como líneas aquellos residuos que no presentan variaciones importantes entre BclI-wt y GLVN y en bastones aquellos que modifican su posición o interacciones por puente hidrógeno.

Cabe destacar, que en la mutante BclI-C221D (Capítulo 3), el residuo Arg121 también afecta la afinidad por Zn(II) al ser capaz de coordinar al residuo mutado Asp221 (Figura 10). Es decir, que el residuo de Arg121 posee un rol clave en la modulación de la unión del Zn(II) en el sitio Zn2. A su vez, en concordancia con los resultados del Capítulo 3, observamos que modificaciones en el sitio Zn2 producen cambios sustanciales en la funcionalidad de la enzima. Es así que, lejos de ser un sitio de unión a Zn(II) accesorio, es el sitio que caracteriza a la actividad β -lactamasa y que puede adaptarse para responder a la presión de selección del ambiente.

5.3.4 Efectos de las propiedades proteicas estudiadas en la capacidad de conferir resistencia de las MBLs para distintos antibióticos β-lactámicos

En la sección 5.2.1 se evaluó cómo la sustitución G262S afecta la eficiencia hidrolítica de BclI contra otros sustratos distintos de cefalexina. En general, vemos que las actividades se mantienen o aumentan levemente para sustratos que son eficientemente hidrolizados por la enzima (en el orden de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Para el caso de ceftazidima, un sustrato con baja actividad, sí existe un aumento más marcado en la eficiencia hidrolítica: del orden de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ al orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Es decir que la mutación G262S afecta el mecanismo catalítico de la enzima de manera que puede aumentar la actividad para sustratos pobres, mientras que en el caso de sustratos que ya son eficientemente hidrolizados, se mantiene la actividad. Esto nos demuestra que las metalo-β-lactamasas de clase B1, que son de por sí promiscuas, tienen el potencial de seguir aumentando su espectro de sustratos sin ir en detrimento de su eficiencia catalítica contra los antibióticos que ya son bien hidrolizados.

Al poner a prueba la resistencia conferida contra otras dos cefalosporinas distintas de cefalexina: cefotaxima y ceftazidima, se observó que en medio LB simple y en LB suplementado con Zn(II) las tendencias generales del efecto de las mutaciones se conservan. Las variaciones en la magnitud de dichos efectos probablemente estén relacionadas con otras características propias del sustrato, tales como su permeabilidad o la contribución de otros sistemas de la bacteria a la resistencia. Vemos entonces que los efectos compensatorios en estabilidad y afinidad por Zn(II), ejercidos por las mutaciones V112A y N70S, en el contexto de G262S, no son una particularidad del antibiótico cefalexina, sino que contribuyen globalmente a mejorar el desempeño de la enzima *in vivo* contra distintos sustratos.

En resumen, hemos demostrado que las interacciones epistáticas mediadas por los efectos de las mutaciones en la eficiencia catalítica, la estabilidad y la afinidad por el cofactor Zn(II) pueden delinear los caminos evolutivos posibles en las MBLs. Estos efectos se pusieron de manifiesto gracias al uso en conjunto de caracterizaciones bioquímicas clásicas, experimentos en el medio periplasmáticos y ensayos de CIMs en distintas condiciones. Este tipo de abordaje combinado es necesario para comprender globalmente los múltiples efectos de las mutaciones en la evolución de proteínas.

5.3.5 Descripción del mapa genotipo-aptitud en MBLs

Existe un nuevo paradigma en el estudio de la evolución natural, al cual Dean y Thornton denominaron “síntesis funcional”, que intenta fusionar la biología evolutiva con la biología molecular experimental, con el fin de brindar inferencias más fuertes respecto a los mecanismos de la evolución [126]. En la síntesis funcional se combinan técnicas de análisis evolutivo y filogenético con técnicas de biología molecular, bioquímica y biología estructural. El viejo paradigma de la biología evolutiva se focalizaba exclusivamente en marcadores de polimorfismos genéticos y divergencia, ignorando el fenotipo. En cambio, la síntesis funcional apunta a develar los mecanismos mediante los cuales las mutaciones producen nuevos fenotipos, de manera de determinar las causas y mecanismos biológicos de la adaptación [126].

En el Capítulo 4 se explicó la metáfora del paisaje de aptitud, la cual se ha utilizado extensamente para explicar los procesos de adaptación. Weinreich y colaboradores recrearon experimentalmente el paisaje de aptitud de la β -lactamasa TEM [40]. Este trabajo permitió responder preguntas básicas acerca de la accesibilidad de caminos evolutivos y la relevancia de la epistasis en la evolución adaptativa. En el presente trabajo, se reconstruyó el paisaje de aptitud para una MBL evolucionada en el laboratorio, encontrando coincidencia en las conclusiones principales: los caminos adaptativos hacia un óptimo son una pequeña fracción de todos los caminos posibles y esta limitación se debe a la presencia de interacciones epistáticas.

Sin embargo, una descripción mecanística completa de un paisaje adaptativo requiere de mapas que describan las transformaciones de genotipo a fenotipo y de fenotipo a aptitud. El mapa genotipo-aptitud es la suma de estos dos mapas componentes [126]. Así es que, habiendo caracterizado distintos aspectos moleculares de las variantes en el paisaje de aptitud de la MBL BclI evolucionada, nos planteamos evaluar cuantitativamente la contribución de estas propiedades moleculares a la aptitud, es decir, a la capacidad de conferir resistencia.

Para ello, en primer lugar graficamos los valores de CIMs para cefalexina en función de la actividad determinada con enzimas purificadas y con extractos periplasmáticos (Figura 37). Observamos que en el caso de las actividades determinadas con enzimas purificadas existe una correlación muy pobre entre ambas variables ($R^2=0,24$) (Figura 37 A). En cambio, los valores de CIMs en función de la actividad determinada con extractos periplasmáticos muestran una correlación con un $R^2=0,74$ (Figura 37 B). Por lo expuesto en las secciones anteriores, es de esperar que en las medidas de actividad periplasmática se engloben otras propiedades que determinan la

cantidad de proteína activa en el periplasma, como la estabilidad y la afinidad por Zn(II). Es decir, que esta correlación puede estar reflejando no sólo la contribución de la actividad a la CIM, sino también de otras propiedades.

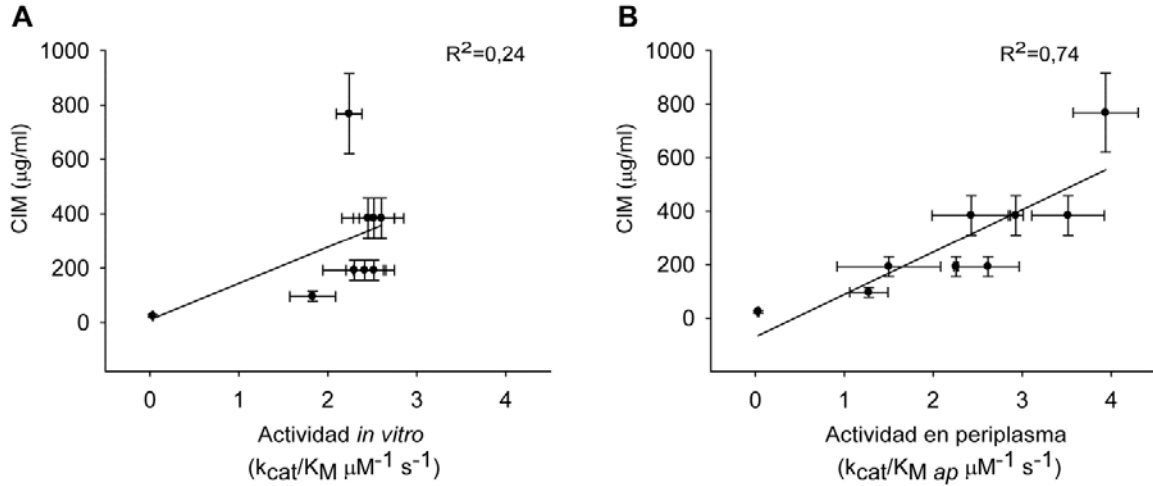


Figura 37: Correlación entre los valores de CIMs para cefalexina conferidos a *E. coli* y la actividad de cada enzima *in vitro* y en periplasma.

Se graficaron los valores de CIM para cefalexina para cada mutante de BclI en función de la actividad determinada *in vitro* A) o la actividad determinada con extractos periplasmáticos B). Los puntos se ajustaron a una línea recta y se obtuvieron los valores de R² indicados en cada gráfico.

Nos planteamos entonces cómo evaluar la contribución de las otras propiedades analizadas. Asumiendo un modelo simple, podemos considerar que la CIM es proporcional a la actividad y a la cantidad de enzima activa ([E]_{act}) en el periplasma:

$$CIM \propto \text{Actividad Enzimática} \times [E]_{act}$$

A su vez, la cantidad de enzima activa estaría determinada por la proporción de proteína correctamente plegada y por la proporción de proteína unida al cofactor Zn(II). Para transformar los datos con los cuales contamos de manera de evaluar cuantitativamente la contribución de los distintos factores a la resistencia, definimos los siguientes factores empíricos de corrección:

$$\text{Factor estabilidad} = \frac{T_{Ma \text{ mut}}}{T_{Ma \text{ wt}}}$$

$$\text{Factor Zn} = \frac{CIM_{LB}}{CIM_{\text{exceso de Zn(II)}}}$$

El “Factor estabilidad” nos da una medida relativa del cambio en T_{Ma} respecto a BclI-wt. El “Factor Zn(II)” nos da una medida de la dependencia que tiene la CIM respecto a la disponibilidad

de Zn(II) en el medio, lo cual se relaciona con la afinidad por dicho ión. Esperaríamos entonces que la cantidad de enzima activa sea proporcional a dichos factores:

$$[E]_{act} \propto \text{Factor estabilidad} \times \text{Factor Zn}$$

Luego, multiplicamos estos factores individualmente y combinados, por las actividades determinadas *in vitro*, según los siguientes modelos:

- A) *Actividad predicha* = *Actividad in vitro***
- B) *Actividad predicha* = *Actividad in vitro* × *Factor estabilidad***
- C) *Actividad predicha* = *Actividad in vitro* × *Factor Zn***
- D) *Actividad predicha* = *Actividad in vitro* × *Factor estabilidad* × *Factor Zn***

En la Figura 38 se muestran los valores de CIMs graficados en función de las actividades predichas por cada modelo. Se observa que el modelo que sólo considera la contribución de la estabilidad y la actividad *in vitro* explica muy poco de la variación de la CIMs (Figura 38 B). En cambio, al multiplicar la actividad *in vitro* por el “Factor Zn” se obtiene un $R^2=0,98$ (Figura 38 C). Esto nos indica que la contribución de la afinidad por Zn(II) es el factor de mayor peso en diferenciar la capacidad de conferir resistencia de enzimas con eficiencias hidrolíticas similares.

De todas maneras, el efecto de la captación del Zn(II) no es totalmente independiente de la estabilidad. Diversos experimentos sugieren que el Zn(II) es necesario para el correcto plegamiento de las MBLs y que estabilizaría la estructura [91,145] . Entonces, cabe destacar que es posible que existan efectos estabilizadores que no estén siendo reflejados con las metodologías empleadas pero que estén englobados en el “Factor Zn”.

En el Capítulo 3 vimos un claro ejemplo de cómo una variante de BclI con una eficiencia hidrolítica comparable a la enzima silvestre pero una afinidad por Zn(II) disminuida, resulta en una aptitud menor del organismo portador expuesto a antibióticos β-lactámicos. En el presente Capítulo el efecto de la afinidad por Zn(II) se enfatiza con un mayor número de variantes. Podemos concluir que los valores de CIMs pueden ser explicados a partir de las actividades *in vitro* de las enzimas y su capacidad de captar Zn(II). Es decir, que el mapa genotipo-aptitud en las MBLs se encuentra delineado principalmente por la contribución de la actividad *in vitro* para cada β-lactámico y la capacidad de captar Zn(II).

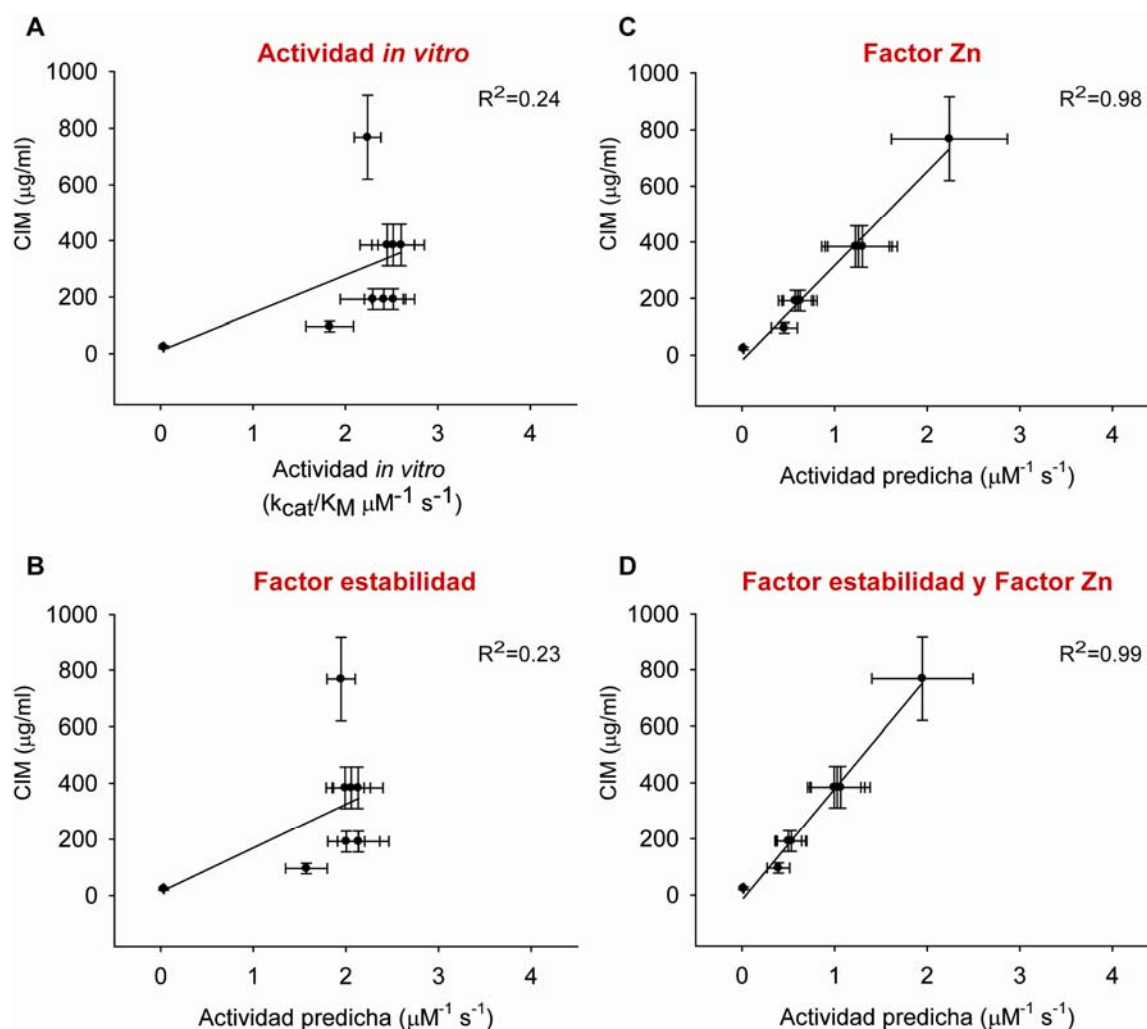


Figura 38: Representación cuantitativa de la contribución de distintos factores proteicos a la capacidad de conferir resistencia.

Se graficó la CIM para cefalexina en función de A) la actividad determinada *in vitro*, B) la Actividad predicha= actividad *in vitro* x Factor estabilidad, C) Actividad predicha= actividad *in vitro* x Factor Zn, D) Actividad predicha= actividad *in vitro* x Factor estabilidad x Factor Zn. En todos los casos se ajustaron los puntos a una línea recta, los valores de R^2 se muestran en cada gráfico.

Como se describió en el Capítulo 3 (sección 3.3), evidencias experimentales indirectas sugieren que la disponibilidad de Zn(II) en el periplasma bacteriano es limitada. Esta limitación es mayor durante la infección debido a las condiciones impuestas por el organismo hospedador, dado que existe un mecanismo de defensa en humanos, la producción de calprotectina, mediante el cual se restringe la disponibilidad de Zn(II) [111]. Es decir, que el mapa genotipo-aptitud descrito para las MBLs, con una importante contribución de la capacidad de captar Zn(II), es representativo de las condiciones *in vivo*.

Conclusiones

Los experimentos realizados en el presente trabajo de Tesis en base a los objetivos propuestos nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- 1) El residuo de Asp conservado en la superfamilia de MBLs en la posición 221 se encuentra reemplazado por un residuo de Cys que actúa como ligando de Zn(II) en las MBLs de relevancia clínica, dado que permite la unión de un segundo ión Zn(II) en el sitio activo con alta afinidad. De esta manera, se asegura la formación de la especie di-Zn(II) en el espacio periplasmático, en el cual puede existir una alta competencia por dicho ión.
- 2) Encontramos que los caminos evolutivos posibles hacia la variante de BcII GLVN, obtenida previamente mediante Evolución Molecular Dirigida, están restringidos por interacciones epistáticas. Las mutaciones V112A y N70S presentan epistasis positiva en el contexto de G262S, siendo sus efectos beneficiosos sólo en el contexto de esta mutación. Así, la mutación G262S define los caminos adaptativos accesibles, dado que sólo los nodos en los cuales se encuentra esta mutación dan lugar a aumentos de resistencia.
- 3) Trabajando con las variantes que presentan la mutación G262S, encontramos que dicha mutación por sí sola produce un aumento en la eficiencia hidrolítica de la enzima, pero a su vez disminuye la estabilidad y la afinidad por Zn(II) de la enzima. A partir de allí los sucesivos aumentos de resistencia con el agregado de las otras sustituciones no pueden explicarse por aumentos de la eficiencia hidrolítica *in vitro*, aunque sí correlacionan con las actividades medidas con extractos periplasmáticos.
- 4) Encontramos que la mutación V112A actúa como estabilizadora en algunas variantes, lo cual sólo se pone de manifiesto mediante ensayos de termoestabilidad realizados con extractos periplasmáticos; mientras que queda enmascarado en ensayos con enzimas purificadas.
- 5) Desde una perspectiva metodológica, las conclusiones 3) y 4) indican la importancia de evaluar las propiedades proteicas en condiciones cercanas al medio donde ejercen su función biológica, para poder correlacionar el efecto de cambios en estas propiedades con cambios en la aptitud a nivel organismo.
- 6) Demostramos que la mutación N70S actúa restaurando la afinidad por Zn(II) en el contexto de la mutación G262S. El efecto de ambas mutaciones sobre la afinidad por Zn(II)

puede explicarse estructuralmente a través de cambios en la segunda esfera de coordinación, que influyen en la distancia metal-ligando en el sitio Zn²⁺.

- 7) Evaluando en forma cuantitativa la contribución de las distintas propiedades moleculares, encontramos que la estabilidad no contribuye a explicar globalmente los cambios en aptitud ante las distintas mutaciones. En cambio, la propiedad de mayor peso que define la capacidad de conferir resistencia ante eficiencias hidrolíticas similares, es la capacidad de captar Zn(II).

Resumen

Los compuestos β -lactámicos constituyen uno de los grupos de antibióticos más empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas. Al poco tiempo de su introducción, se puso de manifiesto la presencia de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias, las cuales evolucionan rápidamente ante la presión de selección impuesta por el uso indiscriminado de dichos compuestos. Dentro de los antibióticos β -lactámicos, las penicilinas y las cefalosporinas de primera generación son los más utilizados comúnmente, mientras que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los carbapenemes se reservan para infecciones graves mediadas por cepas multirresistentes. Las metalo- β -lactamasas (MBLs) constituyen uno de los mecanismos de resistencia más alarmantes diseminado en los últimos años, debido a su capacidad de hidrolizar tanto penicilinas como cefalosporinas y carbapenemes, dejando escasas alternativas para el tratamiento. A esto se suma que no se cuenta al presente con un inhibidor de uso clínico capaz de inactivarlas.

En este contexto, nos propusimos explorar los mecanismos que afectan a nivel molecular la capacidad de conferir resistencia de estas enzimas, y por lo tanto, su evolución. Para ello empleamos como modelo de estudio la enzima BclI de *Bacillus cereus*. Esta enzima, si bien corresponde a un organismo no patógeno, ha sido extensamente empleada como representante de las MBLs de subclase B1, que incluye las enzimas de más impacto clínico, como las IMPs, VIMs y NDMs.

Las MBLs pertenecen a una superfamilia de enzimas, mayormente de actividad hidrolasa, dependientes de la unión de metales divalentes en su sitio activo. En el caso de las MBLs, presentan el potencial de unir dos iones Zn(II) en su sitio activo. Un tema de discusión central en el mecanismo de hidrólisis de las MBLs de subclase B1 ha sido la identidad de la especie activa relevante, pudiendo ser alguna de la especies mono- Zn(II) o la especie di- Zn(II) . Las enzimas de la superfamilia comparten un plegamiento global similar a pesar de una baja homología de secuencia. Los residuos que conforman el sitio activo actuando como constituyen las regiones de mayor conservación de secuencia. Una particularidad de las enzimas B1 es que presentan como ligando de Zn(II) un residuo de Cys en lugar de un residuo de Asp altamente conservado en la superfamilia en la posición 221. En el presente trabajo se estudió la mutante BclI-C221D. Esta variante, si bien presenta una actividad análoga a la enzima silvestre, no es capaz de conferir

niveles de resistencia comparables. Observamos que esto se debe a una disminución en la afinidad por Zn(II) de uno los sitios de unión. Concluimos que el residuo de Cys en dicha posición es necesario para asegurar la unión de Zn(II). A su vez, esta mutante da cuenta de la necesidad de formar la especie di-Zn(II) en el periplasma, donde debe ensamblarse para conferir resistencia, lo cual demuestra que es la especie relevante *in vivo*.

Por otro lado, trabajamos con una variante de BclI obtenida previamente mediante evolución molecular dirigida contra el antibiótico cefalexina. Esta variante, a la cual denominamos GLVN presenta cuatro mutaciones (G262S, L250S, V112A y N70S) y es capaz de conferir niveles elevados de resistencia para cefalexina a células de *Escherichia coli*, en contraste a la enzima silvestre. Con el propósito de estudiar los caminos evolutivos posibles desde la enzima silvestre hasta la cuádruple mutante, se construyeron las 16 combinaciones posibles de estas cuatro mutaciones. Se evaluó la capacidad de conferir resistencia a través de concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs), lo cual nos da una medida de la denominada aptitud a nivel organismo, evaluada sobre las células bacterianas. De esta manera, observamos que sólo aquellas combinaciones que presentan la mutación G262S son capaces de aumentar los niveles de resistencia contra cefalexina. Las mutaciones V112A y N70S presentan epistasis positiva con G262S, dado que producen efectos beneficiosos para la resistencia en el contexto de G262S, mientras que en el contexto silvestre son, respectivamente, neutral y deletérea. Estas cuestiones condicionan los caminos posibles hacia el óptimo GLVN, siendo accesibles para la evolución adaptativa aquellos en los cuales la mutación G262S aparece en los pasos iniciales.

Luego, para analizar los factores moleculares que definen la aptitud para las MBLs, nos planteamos caracterizar en mayor profundidad aquellas variantes que contienen la sustitución G262S. Observamos que esta mutación produce un incremento marcado en la eficiencia hidrolítica de la enzima frente a cefalexina, en forma concomitante al aumento de CIM. Sin embargo, la suma de las demás sustituciones no produce aumentos en la actividad. Encontramos que medidas de actividad realizadas con extractos periplasmáticos muestran una mejor correlación que aquellos realizados con enzimas puras, evidenciando que el estado de la proteína en el periplasma puede ser responsable de las diferencias en la CIMs. Queda en evidencia que existen otras propiedades moleculares, además de la eficiencia hidrolítica *in vitro*, que están siendo afectadas por estas mutaciones y que contribuyen a la aptitud. Es de esperar que la estabilidad y la capacidad de captar Zn(II) de estas enzimas afecte la cantidad de enzima activa en el periplasma, por lo que se prosiguió con el análisis de estos factores.

Se realizaron medidas de la estabilidad térmica en extractos periplasmáticos, y de esta manera se encontró que la mutación G262S produce una disminución en la estabilidad con respecto a la enzima silvestre. La mutación V112A ejerce un efecto compensatorio, aumentando la estabilidad en el contexto de G262S. De igual manera, se observa un efecto estabilizador sobre la triple mutante que contiene las mutaciones G262S/L250S/N70S. Estos aumentos de estabilidad están acompañados de aumentos de CIMs en ambos casos. Sin embargo, la estabilidad por sí sola no alcanza para explicar los aumentos en CIMs observados en los demás casos.

Para evaluar la contribución de la capacidad de captar Zn(II) se realizaron medidas de CIMs en condiciones de disponibilidad de Zn(II) variable. Se observó que los valores de CIMs conferidos por la mutante simple G262S presentan una marcada dependencia con la cantidad de Zn(II) en el medio. Esta dependencia disminuye al sumarse cualquiera de las otras tres mutaciones. La variante GLVN, en cambio, es insensible a las condiciones de Zn(II) en el medio. Mediante ensayos de afinidad *in vitro* comprobamos que la mutación G262S disminuye la afinidad por Zn(II) respecto a la enzima silvestre, y que la mutación N70S compensa esta pérdida restaurando la afinidad a valores cercanos a los de la enzima silvestre.

Evaluando globalmente la contribución de los distintos factores a la capacidad de conferir resistencia de estas MBLs, observamos que ante eficiencias hidrolíticas similares, la capacidad de captar Zn(II) es el factor de mayor peso. Las MBLs captan el Zn(II) en el periplasma bacteriano, donde existe una alta competencia por dicho metal, y cuya disponibilidad depende del medio. Durante el proceso infectivo, los mamíferos producen como mecanismo de defensa la proteína calprotectina, que secuestra Zn(II). Es decir, que en el ambiente donde deben actuar las MBLs para la sobrevivencia de la bacteria, la disponibilidad de Zn(II) se encuentra limitada. Es razonable entonces que la evolución de las MBLs no curse sólo a través de aumentos en la eficiencia hidrolítica, sino que debe ir acompañado de un ajuste en la capacidad de captar Zn(II). Dada la dificultad de diseñar un inhibidor de uso clínico basado en el mecanismo de las MBLs, cabe resaltar que la contribución de la capacidad de unir Zn(II) a la aptitud invita a pensar en nuevas estrategias de inhibición.

Bibliografía

1. Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10: 226–236.
2. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, et al. (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet* 236: 226–228. doi:10.1016/S0140-6736(01)08728-1.
3. Bentley R (2004) The Molecular Structure of Penicillin. *J Chem Educ* 81: 1462. doi:10.1021/ed081p1462.
4. Demain AL, Elander RP (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75: 5–19.
5. Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html. Accessed 4 November 2013.
6. Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1: S19–45.
7. Page MG (2004) Cephalosporins in clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 13: 973–985. doi:10.1517/13543784.13.8.973.
8. Singh GS (2004) Beta-lactams in the new millennium. Part-I: monobactams and carbapenems. *Mini Rev Med Chem* 4: 69–92.
9. Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18: 657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
10. Walsh C (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775–781. doi:10.1038/35021219.
11. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S (2005) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* 105: 395–424. doi:10.1021/cr030102i.
12. Niccolai D, Tarsi L, Thomas RJ (1997) The renewed challenge of antibacterial chemotherapy†. *Chem Commun*: 2333–2342. doi:10.1039/A704497F.
13. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK Jr, Bradley J, Guidos RJ, et al. (2013) 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 56: 1685–1694. doi:10.1093/cid/cit152.
14. Tipper DJ, Strominger JL (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 1133–1141.

15. Tomasz A, Waks S (1975) Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4162–4166.
16. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049.
17. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* 17: 1791–1798. doi:10.3201/eid1710.110655.
18. Maya JJ, Ruiz SJ, Blanco VM, Gotuzzo E, Guzman-Blanco M, et al. (2013) Current status of carbapenemases in Latin America. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11: 657–667. doi:10.1586/14787210.2013.811924.
19. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306–325. doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005.
20. Lim HM, Pène JJ, Shaw RW (1988) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 170: 2873–2878.
21. Bellais S, Aubert D, Naas T, Nordmann P (2000) Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1878–1886.
22. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, et al. (1994) Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta* 1218: 199–201.
23. Zhao W-H, Hu Z-Q (2011) Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol* 6: 317–333. doi:10.2217/fmb.11.13.
24. Zhao W-H, Hu Z-Q (2011) IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol* 37: 214–226. doi:10.3109/1040841X.2011.559944.
25. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, et al. (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5046–5054. doi:10.1128/AAC.00774-09.
26. Johnson AP, Woodford N (2013) Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology* 62: 499–513. doi:10.1099/jmm.0.052555-0.
27. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 11: 355–362. doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7.

28. Crowder MW, Spencer J, Vila AJ (2006) Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc Chem Res* 39: 721–728. doi:10.1021/ar0400241.
29. Poeylout-Palena AA, Tomatis PE, Karsisiotis AI, Damblon C, Mata EG, et al. (2007) A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 5171–5174. doi:10.1016/j.bmcl.2007.06.089.
30. McKenna M (2013) Antibiotic resistance: The last resort. *Nature* 499: 394–396. doi:10.1038/499394a.
31. Smith R, Coast J (2013) The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ* 346: f1493–f1493. doi:10.1136/bmj.f1493.
32. Schenk MF, de Visser JAG (2013) Predicting the evolution of antibiotic resistance. *BMC Biol* 11: 14. doi:10.1186/1741-7007-11-14.
33. Hall A, Knowles JR (1976) Directed selective pressure on a beta-lactamase to analyse molecular changes involved in development of enzyme function. *Nature* 264: 803–804.
34. Orenica MC, Yoon JS, Ness JE, Stemmer WP, Stevens RC (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat Struct Biol* 8: 238–242. doi:10.1038/84981.
35. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes (n.d.). Available: <http://www.lahey.org/Studies/>. Accessed 9 April 2014.
36. Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09.
37. Wang X, Minasov G, Shoichet BK (2002) Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *J Mol Biol* 320: 85–95. doi:10.1016/S0022-2836(02)00400-X.
38. Barlow M, Hall BG (2002) Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics* 160: 823–832.
39. Salverda MLM, De Visser JAGM, Barlow M (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev* 34: 1015–1036. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x.
40. Weinreich DM, Delaney NF, Depristo MA, Hartl DL (2006) Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* 312: 111–114. doi:10.1126/science.1123539.
41. Salverda MLM, Dellus E, Gorter FA, Debets AJM, van der Oost J, et al. (2011) Initial mutations direct alternative pathways of protein evolution. *PLoS Genet* 7: e1001321. doi:10.1371/journal.pgen.1001321.

42. Stemmer WP (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389–391. doi:10.1038/370389a0.
43. Zaccolo M, Gherardi E (1999) The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J Mol Biol* 285: 775–783. doi:10.1006/jmbi.1998.2262.
44. Bershtein S, Goldin K, Tawfik DS (2008) Intense neutral drifts yield robust and evolvable consensus proteins. *J Mol Biol* 379: 1029–1044. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.024.
45. Vakulenko SB, Geryk B, Kotra LP, Mobashery S, Lerner SA (1998) Selection and characterization of beta-lactam-beta-lactamase inactivator-resistant mutants following PCR mutagenesis of the TEM-1 beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1542–1548.
46. Vakulenko S, Golemi D (2002) Mutant TEM beta-lactamase producing resistance to ceftazidime, ampicillins, and beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 646–653.
47. Bebrone C (2007) Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 74: 1686–1701. doi:10.1016/j.bcp.2007.05.021.
48. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H (2001) Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS Lett* 503: 1–6.
49. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, et al. (2001) Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 660–663. doi:10.1128/AAC.45.3.660-663.2001.
50. Garau G, García-Sáez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, et al. (2004) Update of the Standard Numbering Scheme for Class B β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2347–2349. doi:10.1128/AAC.48.7.2347-2349.2004.
51. Fabiane SM, Sohi MK, Wan T, Payne DJ, Bateson JH, et al. (1998) Crystal structure of the zinc-dependent beta-lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. *Biochemistry* 37: 12404–12411. doi:10.1021/bi980506i.
52. Cameron AD, Ridderström M, Olin B, Mannervik B (1999) Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure* 7: 1067–1078.
53. De Seny D, Heinz U, Wommer S, Kiefer M, Meyer-Klaucke W, et al. (2001) Metal ion binding and coordination geometry for wild type and mutants of metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* 569/H/9 (BclI): a combined thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approach. *J Biol Chem* 276: 45065–45078. doi:10.1074/jbc.M106447200.

54. Concha NO, Janson CA, Rowling P, Pearson S, Cheever CA, et al. (2000) Crystal structure of the IMP-1 metallo beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry* 39: 4288–4298.
55. Garcia-Saez I, Docquier J-D, Rossolini GM, Dideberg O (2008) The three-dimensional structure of VIM-2, a Zn-beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* in its reduced and oxidised form. *J Mol Biol* 375: 604–611. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.012.
56. King DT, Worrall LJ, Gruninger R, Strynadka NCJ (2012) New Delhi metallo- β -lactamase: structural insights into β -lactam recognition and inhibition. *J Am Chem Soc* 134: 11362–11365. doi:10.1021/ja303579d.
57. Docquier J-D, Benvenuti M, Calderone V, Stoczko M, Menciassi N, et al. (2010) High-resolution crystal structure of the subclass B3 metallo-beta-lactamase BJP-1: rational basis for substrate specificity and interaction with sulfonamides. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4343–4351. doi:10.1128/AAC.00409-10.
58. Bebrone C, Delbrück H, Kupper MB, Schlömer P, Willmann C, et al. (2009) The Structure of the Dizinc Subclass B2 Metallo- β -Lactamase CphA Reveals that the Second Inhibitory Zinc Ion Binds in the Histidine Site. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4464–4471. doi:10.1128/AAC.00288-09.
59. Hall BG, Salipante SJ, Barlow M (2003) The metallo-beta-lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *J Mol Evol* 57: 249–254. doi:10.1007/s00239-003-2471-0.
60. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G (2011) Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins. *PLoS ONE* 6: e26325. doi:10.1371/journal.pone.0026325.
61. González JM (2009) Estructura atómica y función del segundo sitio de unión a Zn(II) en la metalo-b-lactamasa de *Bacillus cereus* Rosario, Argentina: Universidad Nacional de Rosario.
62. MBLED (n.d.). Available: <http://www.mbled.uni-stuttgart.de/>. Accessed 7 November 2013.
63. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, et al. (2000) Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2023–2027.
64. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, et al. (2001) Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1343–1348. doi:10.1128/AAC.45.5.1343-1348.2001.
65. Oelschlaeger P, Schmid RD, Pleiss J (2003) Modeling domino effects in enzymes: molecular basis of the substrate specificity of the bacterial metallo-beta-lactamases IMP-1 and IMP-6. *Biochemistry* 42: 8945–8956. doi:10.1021/bi0300332.
66. Oelschlaeger P, Mayo SL, Pleiss J (2005) Impact of remote mutations on metallo-beta-lactamase substrate specificity: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Protein Sci* 14: 765–774. doi:10.1110/ps.041093405.

67. Liu EM, Pegg KM, Oelschlaeger P (2012) The sequence-activity relationship between metallo- β -lactamases IMP-1, IMP-6, and IMP-25 suggests an evolutionary adaptation to meropenem exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 6403–6406. doi:10.1128/AAC.01440-12.
68. Hall BG (2004) In vitro evolution predicts that the IMP-1 metallo-beta-lactamase does not have the potential to evolve increased activity against imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1032–1033.
69. Tomatis PE (2007) Evolución molecular dirigida de metalo-b-lactamasas Rosario, Argentina: Universidad Nacional de Rosario.
70. Tomatis PE, Rasia RM, Segovia L, Vila AJ (2005) Mimicking natural evolution in metallo-beta-lactamases through second-shell ligand mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13761–13766. doi:10.1073/pnas.0503495102.
71. Sharrocks AD (1994) A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene* 138: 105–108.
72. Cricco JA (2002) Estudio del rol de un residuo de cisteína en la estructura y función de metalo-beta-lactamasas Rosario, Argentina: Universidad Nacional de Rosario.
73. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
74. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
75. Gallagher SR (2001) One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing Conditions. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1003s00/abstract>. Accessed 22 November 2013.
76. Neu HC, Heppel LA (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem* 240: 3685–3692.
77. Jensch T, Fricke B (1997) Localization of alanyl aminopeptidase and leucyl aminopeptidase in cells of *Pseudomonas aeruginosa* by application of different methods for periplasm release. *J Basic Microbiol* 37: 115–128.
78. Llarrull LI, Fabiane SM, Kowalski JM, Bennett B, Sutton BJ, et al. (2007) Asp-120 locates Zn²⁺ for optimal metallo-beta-lactamase activity. *J Biol Chem* 282: 18276–18285. doi:10.1074/jbc.M700742200.
79. Paul-Soto R, Bauer R, Frère JM, Galleni M, Meyer-Klaucke W, et al. (1999) Mono- and binuclear Zn²⁺-beta-lactamase. Role of the conserved cysteine in the catalytic mechanism. *J Biol Chem* 274: 13242–13249.

80. McCall KA, Fierke CA (2000) Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals. *Anal Biochem* 284: 307–315. doi:10.1006/abio.2000.4706.
81. Llarrull LI, Tioni MF, Kowalski J, Bennett B, Vila AJ (2007) Evidence for a dinuclear active site in the metallo-beta-lactamase BclI with substoichiometric Co(II). A new model for metal uptake. *J Biol Chem* 282: 30586–30595. doi:10.1074/jbc.M704613200.
82. Hunt JB, Neece SH, Ginsburg A (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Anal Biochem* 146: 150–157.
83. Pollák M, Kubáň V (1979) Comparison of spectrophotometric methods of determination of zinc(II) in biological material and study of its complex formation reactions with 4-(2-pyridylazo)resorcinol. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 44: 725–741. doi:10.1135/cccc19790725.
84. Zimmermann M, Clarke O, Gulbis JM, Keizer DW, Jarvis RS, et al. (2009) Metal binding affinities of *Arabidopsis* zinc and copper transporters: selectivities match the relative, but not the absolute, affinities of their amino-terminal domains. *Biochemistry* 48: 11640–11654. doi:10.1021/bi901573b.
85. Kuzmic P (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal Biochem* 237: 260–273. doi:10.1006/abio.1996.0238.
86. Orellano EG, Girardini JE, Cricco JA, Ceccarelli EA, Vila AJ (1998) Spectroscopic characterization of a binuclear metal site in *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *Biochemistry* 37: 10173–10180. doi:10.1021/bi980309j.
87. Llarrull LI, Tioni MF, Vila AJ (2008) Metal content and localization during turnover in *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *J Am Chem Soc* 130: 15842–15851. doi:10.1021/ja801168r.
88. Carfi A, Pares S, Duee E, Galleni M, Duez C, et al. (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J* 14: 4914–4921.
89. Concha NO, Rasmussen BA, Bush K, Herzberg O (1996) Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* 4: 823–836.
90. Badarau A, Page MI (2008) Loss of enzyme activity during turnover of the *Bacillus cereus* beta-lactamase catalysed hydrolysis of beta-lactams due to loss of zinc ion. *J Biol Inorg Chem* 13: 919–928. doi:10.1007/s00775-008-0379-2.
91. Jacquin O, Balbeur D, Damblon C, Marchot P, De Pauw E, et al. (2009) Positively cooperative binding of zinc ions to *Bacillus cereus* 569/H/9 beta-lactamase II suggests that the binuclear enzyme is the only relevant form for catalysis. *J Mol Biol* 392: 1278–1291. doi:10.1016/j.jmb.2009.07.092.
92. Baldwin GS, Galdes A, Hill HA, Smith BE, Waley SG, et al. (1978) Histidine residues of zinc ligands in beta-lactamase II. *Biochem J* 175: 441–447.

93. Baldwin GS, Waley SG, Abraham EP (1979) Identification of histidine residues that act as zinc ligands in beta-lactamase II by differential tritium exchange. *Biochem J* 179: 459–463.
94. Bounaga S, Laws AP, Galleni M, Page MI (1998) The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent beta-lactamase. *Biochem J* 331: 703–711.
95. Rasia RM, Vila AJ (2002) Exploring the role and the binding affinity of a second zinc equivalent in *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *Biochemistry* 41: 1853–1860.
96. Rasia RM, Ceolín M, Vila AJ (2003) Grafting a new metal ligand in the cocatalytic site of *B. cereus* metallo-beta-lactamase: structural flexibility without loss of activity. *Protein Sci* 12: 1538–1546. doi:10.1110/ps.0301603.
97. Wommer S, Rival S, Heinz U, Galleni M, Frere J-M, et al. (2002) Substrate-activated zinc binding of metallo-beta-lactamases: physiological importance of mononuclear enzymes. *J Biol Chem* 277: 24142–24147. doi:10.1074/jbc.M202467200.
98. Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère J-M, et al. (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* 345: 785–795. doi:10.1016/j.jmb.2004.10.070.
99. Selevsek N, Rival S, Tholey A, Heinzle E, Heinz U, et al. (2009) Zinc ion-induced domain organization in metallo-beta-lactamases: a flexible “zinc arm” for rapid metal ion transfer? *J Biol Chem* 284: 16419–16431. doi:10.1074/jbc.M109.001305.
100. De Seny D, Prosperi-Meys C, Bebrone C, Rossolini GM, Page MI, et al. (2002) Mutational analysis of the two zinc-binding sites of the *Bacillus cereus* 569/H/9 metallo-beta-lactamase. *Biochem J* 363: 687–696.
101. Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, et al. (2000) Functional analysis of the active site of a metallo-beta-lactamase proliferating in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2304–2309.
102. González JM, Meini M-R, Tomatis PE, Medrano Martín FJ, Cricco JA, et al. (2012) Metallo- β -lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions. *Nat Chem Biol* 8: 698–700. doi:10.1038/nchembio.1005.
103. Heer A, Alonso LG, de Prat-Gay G (2011) E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder. *Biochemistry* 50: 1376–1383. doi:10.1021/bi101941c.
104. Parkin G (2004) Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chem Rev* 104: 699–767. doi:10.1021/cr0206263.
105. Maret W (2001) Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis – recent insights and current trends. *Biometals* 14: 187–190. doi:10.1023/A:1012945110820.
106. Outten CE, O’Halloran TV (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488–2492. doi:10.1126/science.1060331.

107. Berducci G, Mazzetti AP, Rotilio G, Battistoni A (2004) Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase. *FEBS Lett* 569: 289–292. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.008.
108. Costello LC, Fenselau CC, Franklin RB (2011) Evidence for Operation of the Direct Zinc Ligand Exchange Mechanism for Trafficking, Transport, and Reactivity of Zinc in Mammalian Cells. *J Inorg Biochem* 105: 589–599. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.02.002.
109. Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, et al. (2011) Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 10: 158–164. doi:10.1016/j.chom.2011.07.004.
110. Liu JZ, Jellbauer S, Poe AJ, Ton V, Pesciaroli M, et al. (2012) Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. *Cell Host Microbe* 11: 227–239. doi:10.1016/j.chom.2012.01.017.
111. Brophy MB, Hayden JA, Nolan EM (2012) Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin. *J Am Chem Soc* 134: 18089–18100. doi:10.1021/ja307974e.
112. Smith JM (1970) Natural selection and the concept of a protein space. *Nature* 225: 563–564.
113. Carneiro M, Hartl DL (2010) Colloquium papers: Adaptive landscapes and protein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 Suppl 1: 1747–1751. doi:10.1073/pnas.0906192106.
114. Romero PA, Arnold FH (2009) Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 866–876. doi:10.1038/nrm2805.
115. Da Silva J, Coetzer M, Nedellec R, Pastore C, Mosier DE (2010) Fitness epistasis and constraints on adaptation in a human immunodeficiency virus type 1 protein region. *Genetics* 185: 293–303. doi:10.1534/genetics.109.112458.
116. Weinreich DM, Knies JL (2013) Fisher's geometric model of adaptation meets the functional synthesis: data on pairwise epistasis for fitness yields insights into the shape and size of phenotype space. *Evolution* 67: 2957–2972. doi:10.1111/evo.12156.
117. Poelwijk FJ, Kiviet DJ, Weinreich DM, Tans SJ (2007) Empirical fitness landscapes reveal accessible evolutionary paths. *Nature* 445: 383–386. doi:10.1038/nature05451.
118. Cephalexin - PubChem (n.d.). Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=27447&loc=ec_rcs#. Accessed 25 February 2014.
119. Breen MS, Kemena C, Vlasov PK, Notredame C, Kondrashov FA (2012) Epistasis as the primary factor in molecular evolution. *Nature* 490: 535–538. doi:10.1038/nature11510.

120. Gong LI, Suchard MA, Bloom JD (2013) Stability-mediated epistasis constrains the evolution of an influenza protein. *Elife* 2: e00631. doi:10.7554/eLife.00631.
121. Lozovsky ER, Chookajorn T, Brown KM, Imwong M, Shaw PJ, et al. (2009) Stepwise acquisition of pyrimethamine resistance in the malaria parasite. *PNAS* 106: 12025–12030. doi:10.1073/pnas.0905922106.
122. Parera M, Perez-Alvarez N, Clotet B, Martínez MA (2009) Epistasis among deleterious mutations in the HIV-1 protease. *J Mol Biol* 392: 243–250. doi:10.1016/j.jmb.2009.07.015.
123. Bridgham JT, Ortlund EA, Thornton JW (2009) An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution. *Nature* 461: 515–519. doi:10.1038/nature08249.
124. Louis JM, Tözsér J, Roche J, Matúz K, Aniana A, et al. (2013) Enhanced Stability of Monomer Fold Correlates with Extreme Drug Resistance of HIV-1 Protease. *Biochemistry*. doi:10.1021/bi400962r.
125. Blance SJ, Williams NL, Preston ZA, Bishara J, Smyth MS, et al. (2000) Temperature-sensitive suppressor mutations of the Escherichia coli DNA gyrase B protein. *Protein Sci* 9: 1035–1037.
126. Dean AM, Thornton JW (2007) Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat Rev Genet* 8: 675–688. doi:10.1038/nrg2160.
127. Liberles DA, Teichmann SA, Bahar I, Bastolla U, Bloom J, et al. (2012) The interface of protein structure, protein biophysics, and molecular evolution. *Protein Sci* 21: 769–785. doi:10.1002/pro.2071.
128. Gierasch LM (2011) A career pathway in protein folding: From model peptides to postreductionist protein science. *Protein Sci* 20: 783–790. doi:10.1002/pro.615.
129. Huang W, Palzkill T (1997) A natural polymorphism in β -lactamase is a global suppressor. *PNAS* 94: 8801–8806.
130. Kather I, Jakob RP, Dobbek H, Schmid FX (2008) Increased folding stability of TEM-1 beta-lactamase by in vitro selection. *J Mol Biol* 383: 238–251. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.082.
131. Sideraki V, Huang W, Palzkill T, Gilbert HF (2001) A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 283–288. doi:10.1073/pnas.011454198.
132. Schock HB, Garsky VM, Kuo LC (1996) Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity. *J Biol Chem* 271: 31957–31963.
133. Dudev T, Lin, Dudev M, Lim C (2003) First–Second Shell Interactions in Metal Binding Sites in Proteins: A PDB Survey and DFT/CDM Calculations. *J Am Chem Soc* 125: 3168–3180. doi:10.1021/ja0209722.

134. Tomatis PE, Fabiane SM, Simona F, Carloni P, Sutton BJ, et al. (2008) Adaptive protein evolution grants organismal fitness by improving catalysis and flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20605–20610. doi:10.1073/pnas.0807989106.
135. Morán-Barrio J, Limansky AS, Viale AM (2009) Secretion of GOB metallo-beta-lactamase in *Escherichia coli* depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: completion of folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2908–2917. doi:10.1128/AAC.01637-08.
136. Morán-Barrio J, González JM, Lisa MN, Costello AL, Peraro MD, et al. (2007) The metallo-beta-lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site. *J Biol Chem* 282: 18286–18293. doi:10.1074/jbc.M700467200.
137. Hu Z, Gunasekera TS, Spadafora L, Bennett B, Crowder MW (2008) Metal content of metallo-beta-lactamase L1 is determined by the bioavailability of metal ions. *Biochemistry* 47: 7947–7953. doi:10.1021/bi8004768.
138. Tottey S, Waldron KJ, Firbank SJ, Reale B, Bessant C, et al. (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455: 1138–1142. doi:10.1038/nature07340.
139. cefotaxime - PubChem (n.d.). Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=9102>. Accessed 28 February 2014.
140. Ceftazidime - PubChem (n.d.). Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5481173>. Accessed 28 February 2014.
141. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 179: 125–142.
142. ProtScale Tool: Normalized consensus hydrophobicity scale. (n.d.). Available: <http://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Eisenberg.html>. Accessed 19 December 2013.
143. Sanchez-Ruiz JM (2010) Protein kinetic stability. *Biophys Chem* 148: 1–15. doi:10.1016/j.bpc.2010.02.004.
144. Sarkar M, Smith AE, Pielak GJ (2013) Impact of reconstituted cytosol on protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 19342–19347. doi:10.1073/pnas.1312678110.
145. Periyannan G, Shaw PJ, Sigdel T, Crowder MW (2004) In vivo folding of recombinant metallo- β -lactamase L1 requires the presence of Zn(II). *Protein Sci* 13: 2236–2243. doi:10.1110/ps.04742704.